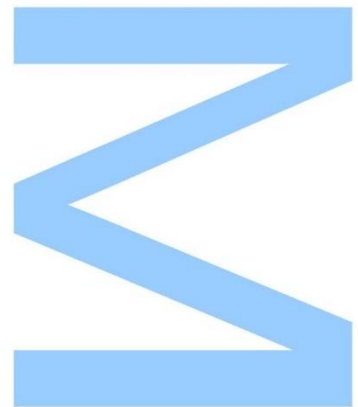


Acastanhamento interno durante o armazenamento da pera 'Rocha': Impacto do baixo O₂ e alto CO₂ no metabolismo e estratégias de controlo



Gaspar Duarte Gomes

Mestrado de Engenharia Agronómica

Departamento de Geociências Ambiente e Ordenamento do Território
2015

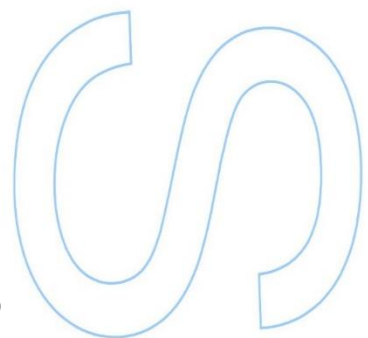
Orientador

Susana Carvalho, Ph.D., Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientadores

Marta Vasconcelos, Ph.D., Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto

Teresa Deuchande, M.Sc., Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto



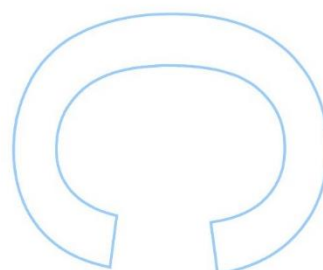
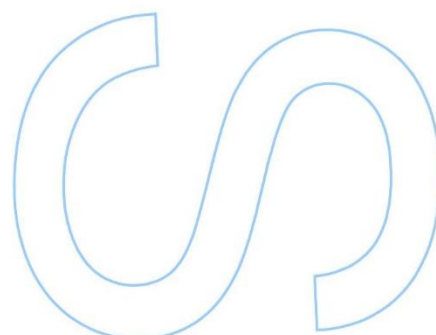
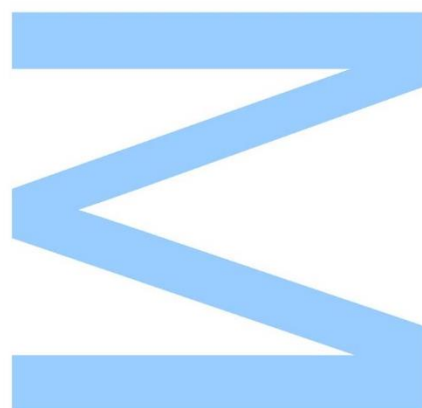


UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto e à Universidade Católica Portuguesa do Porto por me permitirem a oportunidade e concederem os meios para realizar este trabalho no âmbito do Mestrado de Engenharia Agronómica. E ao centro de investigação do IRTA em Espanha, por toda a colaboração no projeto e permitirem a minha visita às suas instalações para expandir os meus conhecimentos.

À Professora Doutora Susana M.P. Carvalho, que aceitou o papel de orientadora e todas as responsabilidades que o mesmo acarreta, apoiando-me e incentivando-me durante todas as etapas na realização deste trabalho.

À Professora Doutora Marta Wilton de Vasconcelos, minha orientadora, pela oportunidade de poder colaborar com a Universidade Católica neste trabalho. Bem como pelo apoio demonstrado para a realização do mesmo.

À Mestre Teresa Deuchande, minha orientadora, que me permitiu colaborar neste trabalho, revelando-se um exemplo de grande inspiração, paciência e compreensão para me ensinar e guiar-me durante todo este processo.

A todas as pessoas com quem tive o prazer de trabalhar aprender e conviver durante estes meses durante a minha estadia na Escola Superior de Biotecnologia.

E à minha família, nomeadamente aos meus pais e ao meu querido irmão, pelo carinho, incentivo e apoio incondicional que me ofereceram ao longo da minha vida.

Resumo

A pera 'Rocha' (*Pyrus communis* L. cv Rocha) é uma cultivar de origem portuguesa, nomeadamente da região do Oeste, que é colhida durante o mês de Agosto e armazenada, em condições de atmosfera controlada (AC) por longos períodos de tempo. Conseguindo desta forma, garantir a sua disponibilidade no mercado durante quase todo o ano. No entanto, durante a sua conservação prolongada em AC, podem desenvolver-se nos frutos, acidentes fisiológicos como o acastanhamento interno (AI), provocando grandes perdas para os produtores. Para prevenir o aparecimento destes problemas, os frutos podem ser tratados com 1-metilciclopropeno (1-MCP) antes do seu armazenamento. No entanto este produto para além de contribuir para prevenção do AI, tem o efeito negativo de inibir os processos associados à maturação dos frutos ("evergreen"), não permitindo a sua maturação, mesmo após a exposição dos mesmos ao ar. Este trabalho teve como objetivos principais: (1) compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos na ocorrência e desenvolvimento do AI em pera 'Rocha' com ênfase no seu sistema antioxidante e metabolismo fermentativo (experiência 1); (2) testar estratégias de controlo para prevenir a incidência do AI e compreender os mecanismos inerentes a este processo na pera 'Rocha' (experiência 2). Relativamente à experiência 1 para o estudo das alterações no sistema antioxidante e metabolismo fermentativo, foram colhidas peras de um pomar localizado na região do Cadaval no estado de maturação tardio (53 N). E após a sua colheita os frutos foram armazenados em 2 condições atmosféricas diferentes durante 145 dias: (1) atmosfera controlada normal (AC) ($3\% \text{ O}_2 + 0.5\% \text{ CO}_2$) simulando as condições atmosféricas de armazenamento comercial utilizadas atualmente para a pera 'Rocha'; (2) atmosfera controlada indutora de AI (ACI) ($1\% \text{ O}_2 + 10\% \text{ CO}_2$) para acelerar o processo de formação de AI nos frutos durante o período experimental estipulado. À colheita e após 45, 95, 125 e 145 dias de armazenamento foram preparadas amostras para as análises bioquímicas, incluindo: concentração de ácido ascórbico (AA), e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), atividade das principais enzimas do sistema antioxidante (catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POX), e a ascorbato peroxidase (APX)), da polifenoloxidase (PPO), e dos níveis de metabolitos fermentativos (etanol e acetaldeído). A incidência e severidade do AI também foram avaliadas durante o armazenamento. Para a experiência 2 os frutos também foram colhidos de um pomar localizado no Cadaval, mas no estado de maturação ótimo (65 N), sendo sujeitos a três tipos de tratamento: (1) armazenamento em ACI, ($2\% \text{ O}_2 + 10\% \text{ CO}_2$), (2) aplicação de 1-MCP, a uma concentração de 312 ppb e posterior armazenamento em ACI, (3) armazenamento dos frutos em atmosfera controlada diferida (ACD), que consiste num período de conservação em frio normal (FN) (0°C , 95% HR) durante 21 dias sendo

subsequentemente armazenados em ACI. À colheita e após 140 dias de armazenamento foram avaliados os níveis de incidência e severidade do AI e determinadas as concentrações dos metabolitos fermentativos, nomeadamente o etanol e acetaldeído.

Da experiência 1 podemos concluir que os níveis elevados de CO₂ durante o armazenamento levam ao aumento da incidência e severidade do AI na pera 'Rocha'. Apresentando diferenças significativas na atividade das enzimas do sistema antioxidante. Diminuindo sobretudo a atividade da SOD, e aumentando a atividade da CAT nos frutos armazenados em ACI, o que explica a diminuição dos níveis de H₂O₂ e a menor atividade da APX nos frutos armazenados em ACI. A PPO ao contrário do que foi observado para outras cultivares, apresenta diferenças significativas entre os frutos em ACI e ACN, parecendo estar correlacionada com a incidência de AI. A diminuição dos níveis de AA apesar de superior nos frutos em ACI, sucedeu-se em ambas as condições de armazenamento. E o aumento da concentração dos metabolitos fermentativos em ACI aparenta estar correlacionada com a incidência de AI. Para a experiência 2 podemos concluir que a ACD não foi eficaz no controlo do AI para a pera 'Rocha', demonstrando até valores de incidência superiores aos frutos do controlo. E que o 1-MCP apesar de não inibir completamente, foi bastante eficaz no controlo do AI nos frutos mesmo em ACI. Mais uma vez, a concentração dos metabolitos fermentativos aparenta estar correlacionada com o aparecimento do AI nos frutos, especialmente o etanol.

Abstract

Pyrus communis L. CV Rocha is a cultivar of Portuguese origin, namely from the western Region on Portugal, which is harvested during August, and preserved in controlled atmosphere (CA), through long periods of time. Guaranteeing its market availability throughout the year. However during its prolonged storage in CA, physiological disorders like internal browning (IB) can occur, which can potentially lead to big economic losses for the producers. To prevent these issues, the pears can be treated with 1-methylcyclopropane (1-MCP) before its storage. However this treatment also comes with some side effects, inhibiting the processes associated with maturation of the fruits, remaining in a state also known as “evergreen”, in which the fruits never really mature even after the exposure to normal atmospheric conditions. There were two main objectives of study in this research project: (1) Understand the biochemical mechanisms involved in the occurrence and development of the IB in ‘Rocha’ pear (experiment 1); (2) test strategies to prevent and control IB, and understand the underlying mechanisms of the processes involved on its appearance (experiment 2). For the first experiment, regarding the study of the alterations on the antioxidant and fermentative metabolism, pears were harvested from an orchard located on Cadaval region, at their considered late maturity stage for picking (53 N). And after that, stored in two different types of CA for 145 days: (1) Regular CA (3% O₂ + 0.5% CO₂) which has the optimal gas concentrations for their long term storage; (2) IB inducing CA (ICA) (1% O₂ + 10% CO₂) which accelerates the process of IB during this limited storage time. At harvest and at regular intervals during storage (45, 95, 125 and 145 days), pulp samples were prepared for biochemical analysis, namely, ascorbic acid (AA) concentration and hydrogen peroxide (H₂O₂), as well as determination of the main enzymes from the antioxidant system (catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POX) and ascorbate peroxidase (APX)), polyphenoloxidase (PPO) and also the determination of the fermentative metabolites, like ethanol and acetaldehyde. The IB incidence and severity were also assessed during storage. On the second experiment, the pears were also picked in an orchard located in Cadaval, but on their optimum level of maturity for picking (65N), and then stored in three different kinds of conditions: (1) stored in ICA, (2% O₂ + 10% CO₂); (2) the fruits were treated with 312 ppb of 1-MCP, prior to their storage in ICA; (3) Delayed Controlled atmosphere, which consists in storing the fruits on regular cold storage (0°C, 95% HR) for 21 days before being stored in ICA. At harvest and after 140 days of storage, the IB incidence and severity on the fruits was assessed, as well as the concentration of the fermentative metabolites, namely ethanol and acetaldehyde. From the first experiment, we can conclude that the high levels of CO₂ during storage, increase the incidence and severity of the IB in ‘Rocha’ pear. Revealing differences on

the activity levels of the enzymes from the antioxidant system. Namely the decrease in the SOD activity levels, and increase of the activity levels on the pears stored in ICA, which explain the decrease on the H_2O_2 levels and diminished activity from the APX enzyme. PPO activity, on the contrary to what has been observed for other cultivars, appears to have a connection between IB. The decrease on the AA levels, despite being superior on the ICA stored pears, happened on both storage conditions. The increase of the concentration regarding the fermentative metabolites on the ICA stored pears, also showed a connection with the increase of IB. For the second experiment, we conclude that the DCA was not able to effectively reduce nor control IB for 'Rocha' pear, showing in fact, the highest values of incidence between all the treatments. Regarding 1-MCP, we can conclude that despite not inhibiting completely IB development in ICA, it was quite effective, showing the lowest IB incidence values. Once again the increase of the fermentative metabolites concentration seems to be correlated with the higher IB incidence in pears, especially ethanol.

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	II
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	I
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A PERA 'ROCHA'	3
2.1.1. <i>Enquadramento Taxonómico, origem e morfologia</i>	3
2.1.2. <i>Importância económica da pera 'Rocha'</i>	4
2.2. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE PERA	5
2.2.1. <i>Efeitos da atmosfera controlada</i>	5
2.2.2. <i>Humidade relativa e temperatura</i>	6
2.2.3. <i>Oxigénio e Dióxido de Carbono</i>	6
2.2.4. <i>Etileno</i>	8
2.3. ACIDENTES FISIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA.....	8
2.3.1. <i>Escaldão superficial</i>	9
2.3.2. <i>Acastanhamento interno</i>	9
2.3.3. <i>Polifenoloxidase</i>	11
2.3.4. <i>Peroxidase</i>	12
2.3.5. <i>Compostos fenólicos</i>	13
2.4. MÉTODOS DE PREVENÇÃO DE DESORDENS FISIOLÓGICAS	13
2.4.1. <i>Aplicação de produtos químicos: papel da DPA, etoxiquina e 1-MCP</i>	13
2.4.2. <i>Atmosfera controlada diferida</i>	15
2.5. STRESS OXIDATIVO	16
2.5.1. <i>Espécies Reativas de Oxigénio</i>	16
2.5.2. <i>Sistema antioxidante</i>	18
2.5.3. <i>Antioxidantes enzimáticos</i>	18

2.5.4. Antioxidantes não-enzimáticos.....	21
2.5.5. Ciclo do ascorbato-glutationa (“Halliwell-Asada Pathway”)	22
2.5.6. Metabolismo fermentativo	23
2.5.7. Enzimas metabolismo fermentativo.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. EXPERIÊNCIA 1.....	26
3.2. EXPERIÊNCIA 2.....	26
3.2.1. Metodologia analítica	27
3.2.2. Parâmetros de qualidade	27
3.2.3. Aplicação do 1-MCP	28
3.2.4. Estimativa de incidência e severidade do acastanhamento interno.....	28
3.2.5. Peróxido de hidrogénio	28
3.2.6. Fenólicos	29
3.2.7. Metabolismo Fermentativo.....	29
3.2.8. Ácido ascórbico e dehidroascórbico.....	30
3.2.9. Extração de enzimas	30
3.2.10. Determinação do teor proteico	31
3.2.11. Medição da atividade enzimática	31
3.2.12. Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. EXPERIÊNCIA 1.....	33
4.1.1. Parâmetros de qualidade à colheita	33
4.1.2. Avaliação da incidência do acastanhamento interno.....	34
4.1.3. Níveis de ácido ascórbico e rácio DHA/AA.....	35
4.1.4. Níveis do peróxido de hidrogénio.....	36
4.1.5. Enzimas antioxidantes	38
4.1.6. Níveis da atividade da PPO e concentração de fenólicos	41
4.1.7. Níveis dos metabolitos fermentativos.....	43
4.2. EXPERIÊNCIA Nº2	45
4.2.1. Parâmetros de qualidade à colheita	45
4.2.2. Avaliação da incidência do acastanhamento interno.....	45
4.2.3. Níveis dos metabolitos fermentativos.....	47
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

Lista de Figuras

Figura 1- Distribuição dos pomares de produção de pera 'Rocha' na região do Oeste. Fonte: DRAPLVT (2007)	4
Figura 2-Pera 'Rocha' apresentando sintomas de escaldão superficial reduzido (A) e severo (B). Fonte: Carvalho (2011).....	9
Figura 3: Pera 'Rocha' apresentando acastanhamento do tipo "core browning" (A) e "brown heart" (B). Fonte: Guterres (2013).....	10
Figura 4: Esquema da síntese da formação de pigmentos castanhos (melaninas). Fonte: Yoruk & Marshall (2003)	12
Figura 5: (A) Difenilamina (DPA); (B) Etoxiquina; (C) 1-Metilciclopropeno (1-MCP). Fonte: Drzyzga (2003); Chemspider (2015).	14
Figura 6: Geração de EROs através da transferência de energia. Fonte: (Gill & Tuteja, 2010)	17
Figura 7- Reação catalisada pela SOD. Fonte: Afzal et al. (2014)	18
Figura 8- Reação catalisada pela CAT. Fonte: Afzal et al. (2014)	19
Figura 9: Reação catalisada pela APX. Fonte: Afzal et al. (2014)	19
Figura 10: Reação catalisada pela MDHAR. Fonte: Afzal et al. (2014)	20
Figura 11: Reação catalisada pela DHAR. Fonte: Afzal et al. (2014)	20
Figura 12: Reação catalisada pela GR. Fonte: Afzal et al. (2014)	20
Figura 13: Ciclo do ascorbato-glutationa. Fonte: Latowski et al. (2010)	23
Figura 14: Reação catalisada pelo piruvato. Fonte: Eram & Ma (2013)	24
Figura 15: Reação catalisada pela ADH. Fonte: Eram & Ma (2013).....	24
Figura 16: Acetaldeído. Fonte: Chemspider (2015).....	25
Figura 17: Etanol. Fonte: Chemspider	25
Figura 18- Incidência de acastanhamento interno (A) e índice de severidade de acastanhamento interno (B) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O ₂ + 0.5% CO ₂) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O ₂ + 10% CO ₂).	34
Figura 19- Concentração de ácido ascórbico (A) rácio DHA/AA (B) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O ₂ + 0.5% CO ₂) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O ₂ + 10% CO ₂). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a P=0.05.	35
Figura 20-Concentração de peróxido de hidrogénio em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O ₂ + 0.5% CO ₂) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O ₂ + 10% CO ₂).	

Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a $P=0.05$	37
Figura 21- Atividade da SOD (A), CAT (B), APX (C) e POX (D) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O_2 + 0.5% CO_2) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O_2 + 10% CO_2). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a $P=0.05$	39
Figura 22-Atividade da PPO (A) e da concentração dos fenólicos (B) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O_2 + 0.5% CO_2) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O_2 + 10% CO_2). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a $P=0.05$	41
Figura 23- Concentração de etanol (A) e acetaldeído (B) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal CO_2 (3% O_2 + 0.5% CO_2) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O_2 + 10% CO_2). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a $P=0.05$	43
Figura 24-Incidência de acastanhamento interno (A) e índice de severidade de acastanhamento interno (B) em peras no estado de maturação ótimo, durante o armazenamento em atmosfera controlada indutora (2% O_2 + 10% CO_2), com tratamento de 312 ppb 1-MCP e armazenamento em atmosfera controlada indutora e atmosfera controlada diferida (21 dias Frio normal+ ACI).	46
Figura 25- Níveis dos metabolitos fermentativos à colheita e ao fim de 140 dias de armazenamento, etanol (A) acetaldeído (B) em peras no estado de maturação ótimo, durante o armazenamento atmosfera controlada indutora (2% O_2 + 10% CO_2), armazenamento em atmosfera controlada indutora tratamento com 312 ppb 1-MCP (2% O_2 + 10% CO_2) e atmosfera controlada diferida (21 dias Frio normal+ AC Indutora). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada \pm desvio padrão.	47

Lista de tabelas

Tabela 1-Principais destinos de exportação de pera ‘Rocha’ e principais países de importação de pera internacional. Fonte: Adaptado Observatório Agrícola (2013). 5

Tabela 2- Recomendações das condições de armazenamento de algumas cultivares de pera 7

Tabela 3- Firmeza, peso médio por fruto, tonalidade (hue°), índice de amido, teor de sólidos solúveis (°Brix), acidez total titulável (g ácido málico/L) e rácio teor de sólidos solúveis/acidez titulável (TSS /AT) de peras de um pomar colhidos no estado de maturação tardio. 33

Tabela 4- Firmeza, peso médio por fruto, tonalidade (hue°), índice de amido, teor de sólidos solúveis (°Brix), acidez total titulável (g ácido málico/L) e rácio teor de sólidos solúveis/acidez titulável (TSS /AT) de peras de um pomar colhidas no estado de maturação ótimo. 45

Lista de abreviaturas

1-MCP – 1-Metilciclopropeno
AA – ácido ascórbico
AC – atmosfera controlada
ACD – atmosfera controlada diferida
ACI – atmosfera controlada indutora
AI – acastanhamento interno
APX- ascorbato peroxidase
AsA- L-ácido ascórbico
ATT – acidez total titulável
CAT- catalase
DHA – ácido dehidroascórbico
DOP – Denominação de Origem Protegida
DPA – difenilamina
EDTA – ácido etilenodiamino-tetra-acético
EROs – espécies reativas de oxigénio
FN – frio normal
HPLC – high performance liquid chromatography
HR – humidade relativa
HSD – highest significant difference
OPDA – dicloridrato de 1,2-fenilenodiamina
PF – peso fresco
PMSF – fluoreto de fenilmetanossulfonil
POX – peroxidase
PPO – polifenoloxidase
PVPP – polivinilpolipirrolidona
rpm – rotações por minuto
SOD- superóxido dismutase
TSS – teor em sólidos solúveis

1. Introdução

A produção de pera em Portugal tem um peso considerável na economia do país, tendo atingido em 2013 uma produção total de aproximadamente 195 000 toneladas, sendo que 95% desse valor se encontra representado pela variedade de pera 'Rocha' do Oeste (ANP, 2013). Com um ritmo de escoamento diário de cerca de 610 toneladas, apresenta-se como um dos poucos produtos com um balanço positivo na balança agroalimentar nacional (Portugal Foods, 2012). Estima-se que a impossibilidade de conservar a pera 'Rocha' de forma eficaz, possa levar a perdas económicas na ordem dos 22 a 39 milhões de euros (Almeida, 2013). Dada a elevada importância da pera 'Rocha' para o setor hortofrutícola nacional, é importante o investimento no estudo deste produto hortofrutícola, por forma a desenvolver estratégias que permitam a conservação desta cultivar, garantindo elevados padrões de qualidade durante todo o seu ciclo de vida e potenciando esta mais-valia nacional.

A pera 'Rocha' é uma variedade produzida exclusivamente na região do Oeste onde existem as condições ideais para esta se desenvolver. Graças à utilização de métodos de conservação e armazenamento adotados pela indústria, nomeadamente o armazenamento em atmosfera controlada (AC), a sua comercialização é realizada durante quase todo o ano, permitindo também a sua exportação para diversos países como Brasil, Reino Unido e França para onde segue a maioria da produção (Observatório Agrícola, 2013). No entanto, apesar de a pera 'Rocha' ser considerada uma das cultivares de pera com maior capacidade de conservação (ANP, 2013; Observatório Agrícola, 2013), o seu armazenamento prolongado (até 10 meses), pode levar a certos acidentes fisiológicos, como por exemplo o escaldão superficial e o acastanhamento interno (AI) da polpa, acompanhado de cavidades no interior do fruto, o que pode provocar perdas económicas avultadas para o setor (Frank et al., 2007). Tais acidentes surgem devido ao stress a que os frutos se encontram sujeitos durante o seu armazenamento em AC, nomeadamente as temperaturas baixas, aliadas a concentrações de CO₂ elevadas e baixas concentrações de O₂, provocando alterações no seu metabolismo (Silva, 2006). No entanto, os mecanismos envolvidos no aparecimento destes acidentes fisiológicos na pera 'Rocha' ainda não se encontram estabelecidos.

Até recentemente, os acidentes fisiológicos eram mitigados pela aplicação do antioxidante difenilamina (DPA) nos frutos aquando o seu armazenamento, evitando problemas tais como o escaldão e também retardando o aparecimento do AI durante o armazenamento prolongado. Contudo, a União Europeia decretou a retirada desse

fitofármaco do anexo I da Diretiva 91/414/CEE do Conselho, por questões de segurança alimentar, revogando assim a permissão para a sua utilização (Comissão Europeia, 2013). Atualmente a solução utilizada como substituto do DPA denomina-se 1-metilciclopropeno (1-MCP), que revela resultados positivos no controlo dos acidentes fisiológicos da pera 'Rocha' em AC (Carvalho, 2011). Mas este composto também apresenta inconvenientes, uma vez que dificulta a maturação dos frutos após o armazenamento e afeta as suas qualidades organoléticas, mesmo após a sua exposição ao ar, sendo este fenómeno conhecido por 'evergreen' (Bai et al., 2009; Chiriboga et al., 2012).

Com este trabalho, pretendeu-se aprofundar o estudo dos fatores que podem influenciar o metabolismo dos frutos durante o seu armazenamento e procurar respostas aos problemas relativos aos acidentes fisiológicos, bem como soluções alternativas aos métodos de conservação atuais para esta cultivar. Assim sendo, este estudo envolveu duas experiências com objetivos distintos. Na primeira experiência o objetivo foi compreender os mecanismos bioquímicos envolvidos na ocorrência e desenvolvimento do AI. Para tal foram realizadas diversas análises bioquímicas após o seu armazenamento em atmosfera controlada indutora (ACI), analisando as concentrações do ácido ascórbico (AA) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) nos frutos, bem como a atividade das principais enzimas do sistema antioxidante, incluindo a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a peroxidase (POX), e a ascorbato peroxidase (APX). Avaliou-se também a atividade da polifenoloxidase (PPO), e dos níveis dos metabolitos fermentativos (etanol e o acetaldeído). Na segunda experiência o objetivo foi testar estratégias de controlo para prevenir a incidência do AI, investigando os mecanismos inerentes a estes acidentes fisiológicos na pera 'Rocha'. Para tal os frutos foram sujeitos a dois tipos de tratamentos distintos; 1) aplicação de 312ppb de 1-MCP; 2) utilização da técnica de armazenamento dos frutos em ACD. Testando-se a eficácia destes métodos no controlo do AI nos frutos, através da verificação da incidência de AI nos frutos no final do armazenamento, e da determinação dos níveis dos metabolitos fermentativos, etanol e acetaldeído.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. A PERA 'ROCHA'

2.1.1. Enquadramento Taxonómico, origem e morfologia

A pera Rocha pertence à família Rosaceae, género *Pyrus*, espécie *P. communis* L. e cultivar 'Rocha' (ANP, 2013). Trata-se de uma cultivar com origem portuguesa e crê-se que tenha surgido no ano 1836 em Sintra (ANP, 2013). Ainda hoje, é na Região do Oeste onde se encontra presente a maior área da produção nacional ocupando cerca de 11 000 hectares (Agrotec, 2014), sendo os concelhos do Cadaval, Bombarral, Torres Vedras, Lourinhã, Caldas da Rainha, Mafra, Alcobaça, Óbidos os principais produtores (ANP, 2015) (Fig.1).

Atendendo às características únicas desta cultivar, que a torna tão bem sucedida no mercado nacional e internacional, foi obtida a sua certificação de Denominação de Origem Protegida (D.O.P.) em 1995 pela União Europeia (Monteiro & Caswell, 2009), sendo a sua entidade gestora a Associação Nacional de Produtores de pera 'Rocha' (ANP), e a entidade certificadora a CODIMACO (DRAPLVT, 2007).

A pera 'Rocha' possui uma forma predominantemente redonda e oval, apresentando um calibre médio entre os 60 e os 65 mm, e um peso a rondar os 130 g, a sua epiderme é lisa e pode ter uma cor amarela ou verde-claro, encontrando-se por ela dispersa a carepa, tipicamente unida na base e dispersa pelo resto da superfície (ANP, 2013). Apresenta uma polpa de cor branca, que pode ser crocante ou granulosa dependendo do seu estado de maturação, sendo doce, não ácida e bastante sumarenta, com um perfume ligeiramente acentuado (ANP, 2013). Aliando estas características à sua resistência ao manuseamento, transporte e armazenamento, comparativamente às outras variedades de pera, permitindo a sua comercialização durante todo o ano, tornando esta variedade muito interessante tanto para o mercado nacional como o de exportação (Marques, 2012).

Relativamente à colheita, esta é geralmente realizada na segunda semana de Agosto. No entanto, de forma a garantir que a mesma seja realizada no momento adequado, e com as características adequadas para o seu armazenamento, transporte e venda ao consumidor, são avaliados um conjunto de parâmetros físico-químicos, como a dureza da polpa (que se deve encontrar entre os 5,5 e 6,5 kg/0,5 cm²), teor de sólidos solúveis (idealmente entre 11 e 13° Brix), e acidez titulável (entre 2-3 g/l de ácido málico). De um modo geral estes valores são obtidos cerca de 135 a 140 dias após a floração (ANP, 2013).

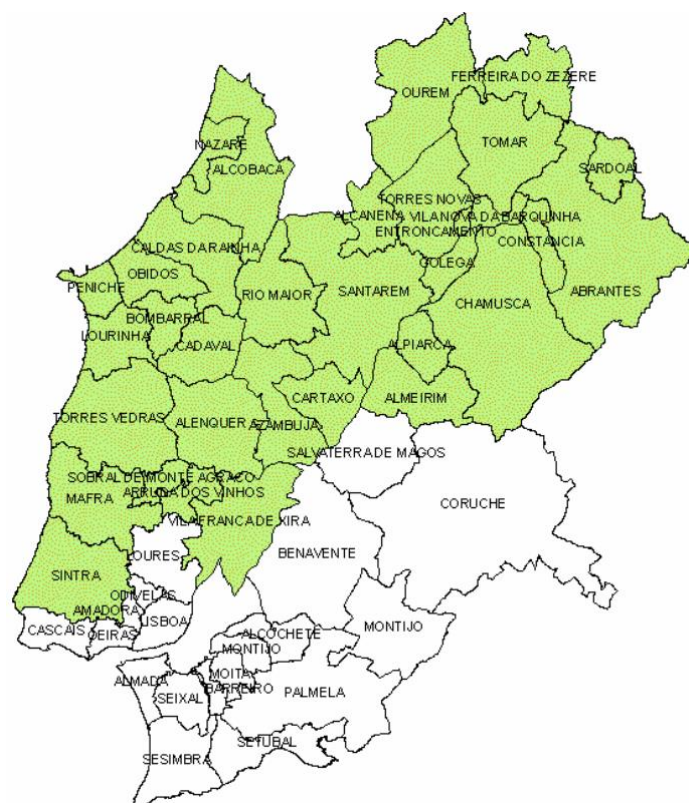


Figura 1- Distribuição dos pomares de produção de pera 'Rocha' na região do Oeste. Fonte: DRAPLVT (2007)

2.1.2. Importância económica da pera 'Rocha'

A produção de pera em Portugal, especialmente a pera 'Rocha', apresenta um peso bastante considerável na economia nacional, dado que representa 95% do total de pera produzida em todo o país, criando 4 700 postos de trabalho durante todo o ano e atingindo os 13 000 postos durante a época de colheita (Agrotec, 2014). Na campanha de 2013/2014 obteve-se uma produção total aproximada de 195 000 toneladas (ANP, 2013), sendo exportadas quase 95 000 toneladas (Agrotec, 2014) destinadas principalmente ao Brasil (35%), Reino Unido (21%) e França (17%) (Observatório Agrícola, 2013) (Tabela 1). No entanto, o país com maior consumo per capita de pera 'Rocha' é a Irlanda (Agrotec, 2014). No caso do mercado nacional, este absorve as restantes 100 000 toneladas, distribuídas através dos canais habituais de comercialização, totalizando assim uma receita global de cerca de 140 milhões de euros (Agrotec, 2014). A pera 'Rocha' é assim um caso de sucesso no setor hortofrutícola nacional, sendo um dos poucos produtos hortofrutícolas produzidos em Portugal, com saldo positivo na balança comercial.

Tabela 1-Principais destinos de exportação de pera 'Rocha' e principais países de importação de pera internacional. Fonte: Adaptado Observatório Agrícola (2013)

	Toneladas (t)	Euros (€)	Percentagem (%)
Exportação:			
Brasil	28.536	21.913.461	35%
Reino Unido	16.588	14.014.749	21%
França	13.666	12.536.433	17%
Federação Russa	4.769	3.132.965	6%
Irlanda	4.067	3.142.403	5%
Importação			
Espanha	6.997	5.626.144	44%
África do Sul	4.891	4.950.255	30%
Argentina	1.880	1.996.322	12%
Holanda	1.174	1.271.108	7%
Alemanha	497	480.639	2,6%

2.2. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO DE PERA

2.2.1. Efeitos da atmosfera controlada

O conceito de atmosfera controlada (AC) é utilizado quando nos referimos a uma atmosfera em que a sua constituição gasosa difere da do ar, cujos níveis de O₂ variam entre os 20 e 21%, cerca de 0,03% de CO₂, e entre 70-71% de N₂, e onde os seus níveis gasosos se encontram em constante monitorização e manutenção (Yahia, 2009). Este conceito não deve ser confundido com o termo atmosfera modificada, que apesar de também se referir à alteração da constituição gasosa da atmosfera inicial, não é realizado qualquer tipo de controlo da mesma após a sua modificação (Yahia, 2009). Esta tecnologia é amplamente utilizada, no setor hortofrutícola, tanto no armazenamento dos produtos como no seu transporte, permitindo alargar a disponibilidade destes produtos perecíveis tanto geograficamente como temporalmente, devido ao aumento do seu tempo de vida, que é um fator fulcral deste tipo de produtos (Yahia, 2009). No entanto, apesar da vasta utilização desta tecnologia para a

conservação de pera 'Rocha', ainda não se encontram completamente elucidados os efeitos da AC na fisiologia e na regulação bioquímica e molecular do fruto. Sabe-se no entanto, que a manipulação e controlo das concentrações de CO₂ e de O₂ nas câmaras de armazenamento, permitem reduzir perdas quantitativas e qualitativas dos produtos hortofrutícolas. Este efeito está associado às alterações nos processos metabólicos dos produtos, atrasando a sua maturação e senescência (Thompson, 2010). Outro aspeto favorável da utilização da AC é o controlo de outros agentes como insetos, fungos e bactérias, atenuando assim a sua incidência durante o período de armazenamento (Yahia, 2009). No entanto, para garantir os benefícios da AC, é necessário ter em linha de conta diversos fatores, como a espécie e cultivar em questão, as suas condições de pré-colheita, o estado de maturação à colheita, e o correto manuseamento, transporte e aplicação de tratamentos pós-colheita antes do seu armazenamento (Thompson, 2010).

2.2.2. Humidade relativa e temperatura

Uma vez que a maioria dos produtos hortofrutícolas são constituídos por quantidades elevadas de água, a manutenção dos níveis da humidade relativa (HR) elevados ($\approx 95\%$ HR), durante o armazenamento permite evitar as perdas de água dos frutos, reduzindo as suas perdas quantitativas (ao nível do peso) e qualitativas (i.e. evitando o enrugar da epiderme causado pela perda de turgência no interior das suas células) (Almeida, 2005; Nguyen, et al., 2007). Relativamente à temperatura de armazenamento, deve proceder-se ao arrefecimento dos frutos o mais rapidamente possível após a sua colheita, mantendo-os posteriormente à temperatura adequada de armazenamento, que no caso da pera 'Rocha' se encontra entre os -1 e 0 °C. Nestas temperaturas é possível reduzir a taxa respiratória dos frutos e ao mesmo tempo evitar danos pelo frio provocados pela utilização de temperaturas demasiado baixas, sendo essencial a manutenção desse equilíbrio por forma a atenuar a evolução dos processos de degradação dos frutos, traduzindo-se então na retenção das suas propriedades por um período de tempo superior (Morris & Brady, 2005).

2.2.3. Oxigénio e Dióxido de Carbono

A inibição da taxa respiratória dos frutos, também é alcançada através da redução dos níveis de O₂ ($<5\%$), que para além de afetarem a respiração também vão diminuir a produção de etileno, através da inibição da atividade da ACC oxidase (1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase), que catalisa o último passo da biossíntese do etileno nas plantas (Kader, 1995; Zhang, et al., 1995). O mesmo acontece no aumento

dos níveis de CO₂, em que concentrações superiores a 1% reduzem a produção de etileno, neste caso através da inibição da atividade das enzimas ACC sintase e ACC oxidase (Kader, 1995). No armazenamento da pera 'Rocha', utilizando-se concentrações de 2% de O₂ e 0,5% de CO₂ durante um período de nove meses, é possível diminuir o seu amarelecimento quando comparado com a atmosfera normal, onde apenas se altera as condições de temperatura e HR. Isto revela uma ligação importante entre a composição gasosa da atmosfera e a cor da epiderme dos frutos. Para além de uma melhor retenção da cor, durante o armazenamento em AC também ocorre uma maior retenção da firmeza durante os 4 e os 7 meses de armazenamento, sucedendo-se o mesmo relativamente à sua suculência e doçura (Galvis-Sánchez, et al., 2003). No entanto, os níveis gasosos adequados ao armazenamento dos frutos podem variar entre as cultivares (Tabela 2).

Tabela 2- Recomendações das condições de armazenamento de algumas cultivares de pera

Cultivar	Atmosfera Normal		Atmosfera controlada			Referência
	Temp (°C)	H.R. (%)	Temp (°C)	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	
Rocha	-1 a 0	90-95	-1 a 0	1 a 3	0.5	Veltman (2002)
B.Hardy	-1 a 0	90-95	-1 a 0	2 a 3	3 a 5	Cavaco (2012)
D.Comice	-1 a 0	90-95	-1 a 0	1,5 a 4	0,5 a 4	Cavaco (2012)
Williams	-1 a 0	90-95	-1 a 0	1 a 2	0 a 0,5	Cavaco (2012)

2.2.4. Etileno

A inibição da produção do etileno (C_2H_4) é um fator extremamente importante, pois é uma hormona chave na regulação e controlo dos vários processos no ciclo de vida das plantas e dos frutos. Destacam-se as respostas de defesa relativamente a stresses bióticos e abióticos, influenciando também os processos de senescência e amadurecimento dos frutos (Kader, 1995; Lin et al., 2009). Neste último caso, essas modificações incluem alterações na cor (dando-se a degradação da clorofila e revelando assim pigmentos secundários já existentes), na firmeza (ocorrendo transformações nas pectinas das paredes celulares, que vão tornar o fruto mais macio), e por fim na transformação dos seus compostos de reserva como os polissacarídeos, em açúcares simples (que vão causar alterações no seu sabor e valor nutricional) (Miller et al., 1952; Mosha & Nyepi, 2005).

2.3. ACIDENTES FISIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO ARMAZENAMENTO EM ATMOSFERA CONTROLADA

Apesar do armazenamento em atmosfera controlada permitir de um modo geral o aumento do tempo de conservação dos produtos hortofrutícolas, podem surgir um conjunto de acidentes fisiológicos, provocados pela sua exposição às condições de armazenamento. Os fatores que influenciam a incidência destes acidentes podem ser divididos em fatores pré-colheita e fatores pós-colheita. No que respeita ao primeiro grupo, estes incluem as características edafo-climáticas do pomar, nomeadamente: (1) as temperaturas e condições hídricas durante o desenvolvimento do fruto no pomar; (2) a composição e estrutura do solo; (3) a aplicação de tratamentos fitoquímicos no pomar; (4) a posição que o fruto ocupa na copa da própria árvore; (5) e por fim, a predisposição genética de cada cultivar (Ferguson, et al., 1999; Schotsmans, et al., 2009). Relativamente aos fatores pós-colheita, podemos incluir essencialmente as condições de armazenamento, nomeadamente (1) a temperatura, (2) os níveis de CO_2 e de O_2 , (3) e a duração do próprio armazenamento, não esquecendo também (4) a influência da data de colheita, ou seja o seu grau de maturação à colheita (Lammertyn, et al., 2000; Schotsmans, et al., 2009). Apesar do conhecimento dos diversos fatores que provocam estes acidentes fisiológicos, na prática, a identificação dos fatores responsáveis pelos sintomas não é simples, dado que estes acidentes se podem desencadear em simultâneo, dificultando assim a análise das causas exatas, tornam o estudo aprofundado desta área essencial, por forma a evitar perdas económicas avultadas.

2.3.1. Escaldão superficial

Este tipo de acidente fisiológico é provocado pelo armazenamento prolongado a temperaturas baixas. Os primeiros sintomas surgem a partir dos 4 meses de armazenamento, manifestando-se através da alteração da cor da hipoderme dos frutos, que apresenta uma cor acastanhada (Fig.2A e B), tornando-os impróprios para a sua venda no mercado fresco (Isidoro & Almeida, 2006; Schotsmans, et al., 2009). Julga-se que o mecanismo que desencadeia este acidente fisiológico esteja relacionado com a oxidação do α -farneseno, que vai gerar trienois conjugados altamente reativos, provocando a disrupção das membranas das células da casca da fruta, levando ao acastanhamento enzimático mediado pela polifenoloxidase (PPO) (Isidoro & Almeida, 2006).



Figura 2-Pera 'Rocha' apresentando sintomas de escaldão superficial reduzido (A) e severo (B). Fonte: Carvalho (2011)

2.3.2. Acastanhamento interno

O AI é um acidente fisiológico que surge tipicamente durante o armazenamento prolongado em atmosfera controlada (Veltman, 2002), revelando-se através de diversos sintomas, como acastanhamento radial ou assimétrico, manchas castanhas secas ou cavidades secas aleatórias na polpa (Franck, et al., 2007). Esta desordem pode ser categorizada em dois tipos de acastanhamento, nomeadamente o (1) 'core browning' ou em português 'decomposição interna' (Fig. 3A) que se traduz na decomposição necrótica húmida da polpa que surge 1 cm abaixo da zona da casca, e no (2) 'brown heart', em português 'coração castanho' (Fig.3B), onde surgem cavidades secas na região carpelar, podendo estender-se por toda a polpa do fruto (Larrigaudière, et al., 2004; Deuchand, et al., 2012).

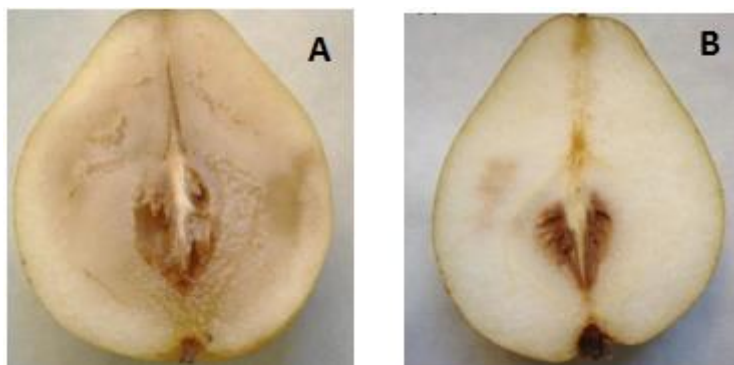


Figura 3: Pera 'Rocha' apresentando acastanhamento do tipo "core browning" (A) e "brown heart" (B).
 Fonte: Guterres (2013).

São diversos os fatores que podem afetar o aparecimento do AI, no entanto, o modo como se conjugam entre si ainda não se encontra elucidado, dificultando a identificação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta desordem fisiológica. O acastanhamento dos tecidos ocorre devido à oxidação enzimática dos compostos fenólicos em o-quinonas pela enzima (PPO) formando pigmentos de cor castanha denominados melaninas, no entanto como esta enzima e o seu substrato se encontram em compartimentos celulares diferentes, supõe-se que esta desordem possa ter origem no rompimento das membranas intracelulares, rutura esta que por sua vez pode ser provocada por diversos fatores (Veltman, et al., 1999). Um dos pontos-chave no desenvolvimento do acastanhamento é a composição gasosa presente no interior dos frutos, nomeadamente as concentrações baixas de O_2 e elevadas de CO_2 , que podem levar à indução do metabolismo fermentativo durante o armazenamento (Franck, et al., 2007). Algumas teorias passam precisamente por esta mudança para o metabolismo fermentativo, que pode gerar uma deficiência energética, alterando os processos de manutenção do fruto. Como tal, o sistema antioxidante pode não conseguir lidar com as espécies reativas de oxigénio geradas, causando a sua acumulação que por sua vez pode provocar o rompimento membranar das células e, consequentemente, o acastanhamento dos tecidos dos frutos (Franck, et al., 2007). Outro mecanismo possivelmente relacionado com a indução do acastanhamento através do metabolismo fermentativo é a acumulação nos frutos, de metabolitos tóxicos para as células, nomeadamente o etanol e o acetaldeído, que podem levar à perda de integridade das membranas e provocar o acastanhamento (Chervin et al., 1996; Franck et al., 2007).

Segundo Larrigaudière et al. (2004), tanto o "core browning" como o "brown heart" podem ocorrer através do mesmo mecanismo ligado aos processos de senescência, onde os sintomas associados ao "brown heart" vão surgir devido a uma aceleração dos processos de desenvolvimento desta desordem, provocado pelos níveis elevados de CO_2 . Assim sendo, tanto o "core browning" como o "brown heart" seriam

consideradas a mesma desordem, onde os níveis elevados de CO₂ durante o armazenamento iriam dar origem a uma sintomatologia diferente que surgiria precocemente, provocada então pela aceleração dos processos de senescência dos frutos.

Ao contrário do escaldão superficial, o AI não apresenta sintomas na parte externa do fruto. Até à data ainda não existem métodos não-destrutivos viáveis para a sua identificação à escala comercial, embora numa escala laboratorial isto possa ser feito com recurso a raios-X, ressonância magnética e espectroscopia de reflexão infravermelho. Por outro lado, ainda não foram desenvolvidos modelos matemáticos para esta cultivar, por forma a prever precocemente os frutos em risco da ocorrência deste acidente fisiológico e assim poder aplicar diferentes metodologias de armazenamento. Deste modo, é fundamental compreender os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do AI na pera 'Rocha' para que se possam desenvolver estratégias de controlo eficazes e assim evitar perdas económicas, tanto para os produtores como para os consumidores (Lammertyn et al., 2000; Franck et al., 2007).

O grau de severidade com que estas desordens afetam os frutos varia com a conjugação dos diversos fatores tanto de pré como pós-colheita. No caso do AI, sabe-se que os fatores de pré-colheita com maior impacto na suscetibilidade dos frutos são o tamanho (os frutos maiores revelam uma maior predisposição para desenvolver acastanhamento) o estado de maturação (frutos mais maduros vão apresentar uma maior suscetibilidade para o acastanhamento) as condições edafo-climáticas dos pomares de origem dos frutos e, por último a composição nutricional dos frutos (Lammertyn et al., 2000; Franck et al., 2007). Relativamente aos fatores de pós-colheita, os mais significativos são as condições de armazenamento dos frutos. Quanto mais elevada for a temperatura durante o armazenamento, maior será a suscetibilidade dos frutos ao acastanhamento. No armazenamento em AC quanto mais baixo o nível de O₂ e mais alta a concentração de CO₂, maior será a probabilidade da incidência de acastanhamento nos frutos (Lammertyn et al., 2000; Franck et al., 2007).

2.3.3. Polifenoloxidase

As polifenoloxidasas (PPO) podem ser divididas em dois grupos: as tirosinases (EC 1.14.18.1), que podem apresentar-se na forma latente e/ou ativa e as lacases (EC 1.10.3.2) (National Library of Medicine, 2011). As tirosinases convertem os monofenóis em o-difenóis por hidroxilação (atividade cresolase) oxidando os o-difenóis resultantes em quinonas (atividade catecolase). As lacases por sua vez têm a sua ação restrita à oxidação dos orto e para-difenois a o-quinonas (Veltman, et al., 1999). As reações

ligadas à enzima PPO são de extrema importância para o setor hortofrutícola, dado que se encontra presente na maioria dos tecidos vegetais, e está intimamente relacionada com os fenómenos de acastanhamento dos produtos hortofrutícolas (Yoruk & Marshall, 2003). O acastanhamento enzimático surge devido à oxidação dos compostos fenólicos (substrato) por parte da PPO, transformando-os em *o*-quinonas, que por sua vez serão polimerizadas em pigmentos denominados melaninas (Fig.4), afetando a qualidade dos produtos e consequentemente a sua comercialização (Yoruk & Marshall, 2003). Estas enzimas podem encontrar-se em diversos compartimentos celulares dependendo de vários fatores, nomeadamente a espécie ou o grau de maturação dos órgãos. No caso da pera estas enzimas encontram-se em maior concentração na casca dos frutos, nomeadamente nos plastídios da célula (cloroplastos e mitocôndrias) mas também no citoplasma (Vámos-Vigyázó & Haard, 1981; Frank et al., 2007).

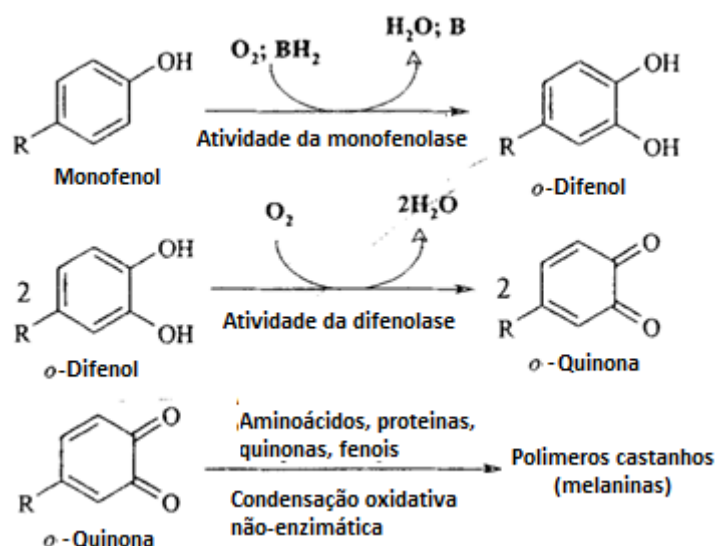


Figura 4: Esquema da síntese da formação de pigmentos castanhos (melaninas). Fonte: Yoruk & Marshall (2003)

2.3.4. Peroxidase

A peroxidase (POX) (EC 1.11.1.7) é outra enzima pertencente ao grupo das oxirredutases, que aparenta estar relacionada com o AI nas peras, realizando a oxidação de diversos compostos aquando na presença de H_2O_2 (Tomás-Barberán & Espín, 2001). A peroxidase parece atuar em sinergia com a PPO na formação do acastanhamento, mas encontra-se dependente da atividade inicial da PPO que gera o H_2O_2 via oxidação dos compostos fenólicos (Tomás-Barberán & Espín, 2001). Estas enzimas encontram-se em duas formas distintas nas plantas, na sua forma solúvel ao nível do citoplasma das células e na forma insolúvel, ligada às paredes celulares (Vámos-Vigyázó & Haard, 1981).

2.3.5. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem uma grande importância nas características organoléticas e qualitativas dos produtos hortofrutícolas. Estes compostos afetam o sabor, aroma e adstringência dos frutos e legumes, e ainda as suas características visuais. Por exemplo, os pigmentos como as antocianinas são os compostos responsáveis pela cor (Tomás-Barberán & Espín, 2001). Estes compostos também aparentam ter uma ação benéfica para a saúde humana ajudando a prevenir doenças crónicas, como cancro e doenças cardiovasculares (Haminiuk, et al., 2012). Paralelamente, os compostos fenólicos têm ainda um papel crucial no AI já que estes vão servir de substrato para as enzimas PPO e POX, sendo então oxidados em quinonas e posteriormente polimerizados em melaninas, gerando assim cor acastanhada característica do AI (Yoruk & Marshall, 2003). Estes compostos encontram-se localizados maioritariamente nos vacúolos das células, o que por sua vez sugere que o AI deverá estar associado ao inicial rompimento das membranas intracelulares que possibilitaria a reação de oxidação dos compostos fenólicos pela PPO ao que se encontra maioritariamente nos plastídeos, gerando então os pigmentos acastanhados no interior do fruto (Franck, et al., 2007).

2.4. MÉTODOS DE PREVENÇÃO DE DESORDENS FISIOLÓGICAS

2.4.1. Aplicação de produtos químicos: papel da DPA, etoxiquina e 1-MCP

A difenilamina (DPA) (Fig.5A) em 2013 era o único produto homologado em Portugal, para a prevenção do escaldão na pera 'Rocha' em atmosfera controlada, o que o tornava uma ferramenta essencial na comercialização nacional e internacional da pera 'Rocha' (CAP, 2010). No entanto, foi proibida a sua utilização pela Comissão Europeia, tendo sido revogadas todas as autorizações existentes para aplicação de produtos fitofarmacêuticos que contivessem DPA por questões de segurança do consumidor, podendo os produtos apresentar apenas um Limite Máximo de Resíduos (LMR) detetáveis de 0,1mg/kg (Comissão Europeia, 2013). Este antioxidante sintético tinha um duplo efeito, uma vez que para além de atuar no controlo do escaldão também reduzia a incidência de AI em AC, mantendo a firmeza, teores de sólidos solúveis e acidez dos frutos na pera 'Rocha' (Silva, et al., 2008). Já o controlo do escaldão era feito através da inibição da oxidação do α -farneseno, evitando a produção de trienois conjugados altamente reativos, que provocam a disrupção das membranas das células da casca, levando ao seu acastanhamento (Isidoro & Almeida, 2006).

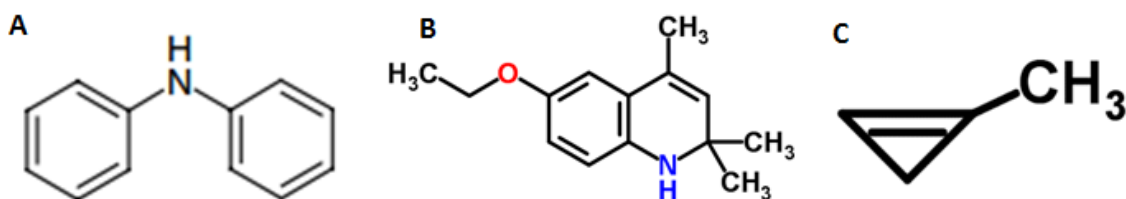


Figura 5: (A) Difenilalamina (DPA); (B) Etoxiquina; (C) 1-Metilciclopropeno (1-MCP). Fonte: Drzyzga (2003); Chemspider (2015).

Após a proibição efetiva da aplicação do DPA nos países da União Europeia, foi emitida uma autorização para a utilização extraordinária da etoxiquina (Fig.5B), permitindo apenas a sua utilização durante 120 dias da campanha desse mesmo ano (Nunes et al., 2013; Tomás & Azevedo, 2013). Em 2014, foram revogadas todas as autorizações existentes para a aplicação de produtos fitofarmacêuticos contendo a substância ativa etoxiquina, impondo-se um Limite Máximo de Resíduos detetáveis de 0,05mg/kg (Comissão Europeia, 2014). Este antioxidante sintético, que atua de forma semelhante ao DPA, revelou-se num estudo com peras 'Anjou', como sendo mais eficaz no controlo do escaldão do que o DPA, apresentando, contudo, menor eficácia no controlo do AI quando comparado com o DPA (Kupferman & Gutzwiller, 2003).

De momento, o único substituto em Portugal aprovado pela Comissão Europeia, pelo menos até 31 de Março de 2016, para o tratamento do escaldão superficial é o 1-metilciclopropeno (1-MCP) (Fig.5C). Este produto é comercializado pela empresa AgroFresh com a designação SmartFresh® (Blankenship & Dole, 2003; Comissão Europeia, 2011). Julga-se que este composto, ao contrário dos anteriores, atua de forma a inibir a síntese do α -farneseno, ligando-se aos recetores de etileno. Deste modo, a aplicação do 1-MCP diminui a sensibilidade dos frutos ao etileno, retardando os processos associados ao amadurecimento dos frutos, nomeadamente a perda de pigmentação e de firmeza. Paralelamente, este também diminui a incidência de desordens na pera 'Rocha' durante o seu armazenamento em AC (Isidoro & Almeida, 2006; Silva et al., 2008; Carvalho, 2011). No entanto, o efeito da aplicação de 1-MCP depende de diversos fatores nomeadamente: (1) espécies e cultivares em que o tratamento é aplicado, podendo diminuir ou potenciar a incidência de desordens nos frutos em que é aplicado; (2) o seu estado de maturação, sendo geralmente o tratamento menos eficaz para frutos num nível de maturação mais avançado; (3) temperatura, podendo não ser tão eficaz para determinadas espécies a temperaturas mais baixas; (4) duração do tratamento, sendo necessário aplicar uma concentração maior no caso de se realizarem tratamentos mais curtos para se obter o mesmo efeito inibidor (Blankenship & Dole, 2003; Carvalho, 2011; Watkins, 2014). Este produto aparenta ser

bastante promissor no tratamento pós-colheita da pera 'Rocha' no entanto a metodologia de aplicação deste produto nesta cultivar ainda não se encontra otimizada. Por exemplo, em certas cultivares de pera, com a aplicação de 1-MCP dá-se o fenómeno de 'evergreen', que consiste no amadurecimento anormal dos frutos à saída das câmaras de armazenamento. Os frutos tratados não são capazes de desenvolver um amadurecimento normal, ficando comprometido o desenvolvimento dos aromas, texturas e sabores característicos dos frutos e expectáveis por parte do consumidor, podendo afetar a procura dos mesmos (Bai et al., 2009; Chiriboga et al., 2012). Assim, são necessários mais estudos por forma a definir as concentrações e duração do tratamento mais adequados, estudando o modo como a aplicação do 1-MCP se relaciona com os diversos fatores pré e pós-colheita. Estes estudos irão permitir uma aplicação adequada do 1-MCP na conservação prolongada de pera 'Rocha', mantendo um elevado padrão de qualidade durante o seu armazenamento sem comprometer o seu amadurecimento (Alpalhão et al., 2006; Isidoro & Almeida, 2006).

2.4.2. Atmosfera controlada diferida

A atmosfera controlada diferida (ACD) é um método de armazenamento muito semelhante ao armazenamento em AC, apresentando apenas a diferença de se armazenar os frutos por um determinado período de tempo em frio normal, antes de estes serem transferidos para um ambiente de AC. A utilização desta estratégia de armazenamento demonstrou ser eficaz na redução do AI em peras 'Conference', armazenadas imediatamente em AC, que apresentavam uma maior incidência de AI e possuíam uma carga energética (ATP) inferior à dos frutos armazenados em ACD (após 3 semanas em frio normal) durante os primeiros dois meses de armazenamento (Saquet, et al., 2003). Com base nos resultados obtidos neste estudo os autores consideraram que os níveis superiores de ATP poderiam contribuir para a reduzida incidência de acastanhamento nestes frutos, sugerindo ainda que o atraso no armazenamento em AC poderia contribuir para a adaptação dos frutos às condições de AC durante o início do armazenamento, conferindo-lhes maior resistência ao desenvolvimento do AI. Assim os frutos que se encontravam num stress faseado, lidando primeiro com as temperaturas reduzidas e só depois com as concentrações gasosas aplicadas na AC, conseguem adaptar-se de forma mais adequada ao stress causado pelo armazenamento, apresentando níveis mais elevados de atividade metabólica e consequentemente ATP quando comparados com os frutos que foram armazenados em atmosfera controlada diretamente (Saquet et al., 2003). Verlinden et al. (2002) também observaram resultados positivos no controlo do AI em pera

'Conference' após 8 meses de armazenamento em ACD com um período de 21 dias em frio normal, comparativamente com o armazenamento imediato em atmosfera controlada (Verlinden et al., 2002; Saquet et al., 2003). No caso da pera 'Rocha', os estudos realizados não têm sido conclusivos. Silva et al., (2009) verificaram que o armazenamento dos frutos em frio normal, durante 30 dias, e posterior transferência para AC durante 8 a 9 meses, não revelaram diferenças na incidência de desordens fisiológicas quando comparados com os frutos armazenados diretamente em atmosfera controlada. Já Carvalho (2011), demonstrou que frutos armazenados em frio normal durante dois meses e posteriormente em AC durante seis meses, revelaram valores de incidência de AI inferiores ($2.5\% \pm 1.0$) quando comparados com os frutos armazenados em AC ($6.0\% \pm 3.6$). No entanto, é de notar que o efeito da ACD na incidência do AI não parece prolongar-se após a saída dos frutos do armazenamento, demonstrando em AC resultados relativamente melhores, na percentagem de incidência de acastanhamento nos frutos aos 7 e 14 dias após o armazenamento (Carvalho, 2011). Como tal é necessário realizar mais estudos em pera 'Rocha' que englobem a utilização da ACD.

2.5. STRESS OXIDATIVO

2.5.1. Espécies Reativas de Oxigénio

As espécies reativas de oxigénio (EROs) surgem como consequência do metabolismo aeróbico das células, sendo constantemente geradas nas plantas devido a vários processos metabólicos e de oxirredução. No entanto, os níveis de EROs são mantidos sob controlo pelo sistema antioxidante, que evita a sua acumulação, garantindo o bom funcionamento do organismo (Bhattacharjee, 2010). Para além de serem produtos secundários do metabolismo aeróbico, as EROs parecem estar também relacionadas com a morte programada das células e às respostas das plantas a stresses bióticos (patogénios, herbívoros) e abióticos (seca, salinidade, radiação UV, hipoxia, entre outros), atuando como moléculas de sinalização de resposta ao stress (Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004). No entanto, quando surge um desequilíbrio na geração destas moléculas, ou no seu controlo por parte do sistema antioxidante, geralmente causado por stresses externos, estas espécies reativas podem acumular-se nas células da planta, levando ao denominado "stress oxidativo". Nestas condições poderão ocorrer danos celulares irreversíveis incluindo: (1) modificação das cadeias de ácidos nucleicos, (2) oxidação das cadeias proteicas alterando a sua estrutura e potencialmente o seu funcionamento normal (Mittler, 2002; Silva, et al., 2009); (3) peroxidação dos ácidos gordos polinsaturados das membranas, alterando a sua fluidez e permeabilidade,

levando à perda de integridade das mesmas. No caso dos frutos, a perda de integridade das membranas poderá traduzir-se no desenvolvimento de desordens fisiológicas como o AI, provocado pela rutura dos compartimentos que contêm os compostos fenólicos e a enzima PPO. O processo culmina com a oxidação enzimática dos compostos fenólicos e com o aparecimento das melaninas (Hodges, et al., 2004; Silva, 2006; Franck, et al., 2007).

As EROs propriamente ditas são formas parcialmente reduzidas do oxigénio atmosférico (O_2) provocadas pela transferência de eletrões. Dentro destas espécies encontramos o singlete de oxigénio (1O_2), o superóxido ($\cdot O_2^-$) o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo ($\cdot OH$). O singlete de oxigénio (1O_2) surge com a excitação do O_2 . No caso do superóxido ($\cdot O_2^-$), este é formado pela transferência de um eletrão para o O_2 ; o H_2O_2 surge pela transferência de 2 eletrões. Por fim, o radical hidroxilo ($\cdot OH$), que é a ERO mais reativa de todas vai formar-se através da transferência de 3 eletrões, na designada reação de Fenton, onde o Fe^{2+} vai reagir com o H_2O_2 levando à formação dos radicais hidroxilo e Fe^{3+} (Fig.6) (Mittler, 2002; Aguiar, et al., 2007).

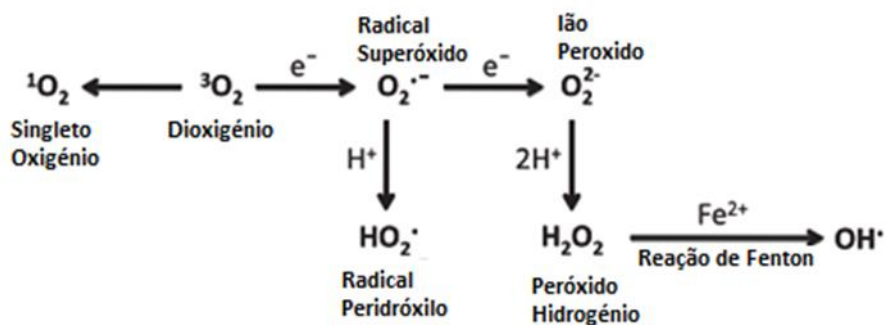


Figura 6: Geração de EROs através da transferência de energia. Fonte: (Gill & Tuteja, 2010)

A produção das EROs dá-se maioritariamente nos organelos ligados ao metabolismo aeróbico, nomeadamente nos cloroplastos e peroxissomas, no caso dos tecidos verdes e nas mitocôndrias no caso dos tecidos não-verdes, ou em situações de obscuridade. Os peroxissomas existem na maioria das células eucarióticas, possuindo diversas funções na planta conforme a sua especialização e localização, nomeadamente na conversão dos ácidos gordos presentes nas sementes em açúcares para o crescimento da planta. Estes organelos encontram-se envolvidos nas reações de fotorrespiração e podem também estar ligados à senescência foliar em situações de stress, sendo fontes de produção de moléculas sinalizadoras da planta como o superóxido, peróxido e óxido nítrico (NO) (Río, et al., 2003). Os locais de produção de

superóxido nos peroxissomas são a sua matriz e uma pequena cadeia transportadora de eletrões que se encontra na sua membrana (Río, et al., 2003).

Apesar das EROs serem produzidas em maior quantidade através dos processos relativos à fotossíntese, neste trabalho, iremos debruçar-nos apenas na produção nos tecidos não verdes, dado que a origem destes acidentes fisiológicos surge no interior (polpa) dos frutos (Hodges, et al., 2004).

2.5.2. Sistema antioxidante

A produção de EROs encontra-se intimamente ligada ao funcionamento normal da planta, nomeadamente ao metabolismo respiratório e também possivelmente aos mecanismos de sinalização relacionados com as respostas das plantas ao stress. A produção da EROs tem no entanto, que ser controlada pelas células, caso contrário estas encontrar-se-iam em constante stress oxidativo. Como tal, as plantas possuem mecanismos de defesa, nomeadamente os antioxidantes enzimáticos, tais como a SOD, a CAT e a POX e ainda as enzimas do ciclo ascorbato-glutationa (ou "Halliwell-Asada Pathway") (Río, et al., 2003). Relativamente aos antioxidantes não-enzimáticos, o ácido ascórbico a glutathione, compostos fenólicos e moléculas hidrofóbicas como α -tocoferol, β -carotenos e xantofilas distribuídos pelos diferentes compartimentos das células têm como função manter os níveis apropriados das EROs por forma a garantir o bom funcionamento celular (Río, et al., 2003; Silva, 2006).

2.5.3. Antioxidantes enzimáticos

2.5.3.1. Superóxido dismutase

As enzimas superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), podem ser consideradas como a primeira linha de defesa do sistema antioxidante, encontrando-se disponíveis nos cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomas ou apoplastos. Estas metaloenzimas são responsáveis pela conversão dos aniões de superóxido ($O_2^{\bullet -}$) em H_2O_2 (Fig.7), e pode ser encontrada na planta em três grupos de isoenzimas, que vão atuar de forma diferente mediante a molécula metálica associada (cofator). As SOD-Cu/Zn encontram-se maioritariamente no citosol, nas mitocôndrias e nos plastídeos. As SOD-Mn, encontram-se nas mitocôndrias e peroxissomas e por fim as SOD-Fe, estão presentes nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias e peroxissomas (Szóllósi, 2014).



Figura 7- Reação catalisada pela SOD. Fonte: Afzal et al. (2014)

2.5.3.2. *Catalase*

A catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) tem como papel degradar o H_2O_2 em água e oxigénio (Fig.8). Esta enzima encontra-se maioritariamente nos peroxissomas, no entanto também se encontra nas mitocôndrias e no citoplasma atuando ao longo da cadeia transportadora de eletrões das mitocôndrias, na oxidação dos ácidos gordos e também na oxidação fotorrespiratória. Relativamente à sua categorização, esta pode ser dividida em três grupos de isoformas, denominados CAT1, CAT2 e CAT3, no entanto ainda não foi revelado o número exato de isoformas presentes no genoma da pera 'Rocha' (Sharma & Ahmad, 2014).

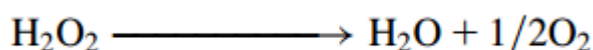


Figura 8- Reação catalisada pela CAT. Fonte: Afzal et al. (2014)

2.5.3.3. *Ascorbato peroxidase*

A ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11) é uma enzima que integra a Classe I das heme-peroxidases, e utiliza o ácido ascórbico como dador de eletrões de forma a converter o H_2O_2 em água, oxidando o ascorbato e formando duas moléculas de monodesidroascorbato (MDA) (Fig.9). Dada a sua grande especificidade pelo ascorbato, a sua atividade é altamente dependente da concentração do substrato, diminuindo rapidamente a sua ação e estabilidade em concentrações inferiores, a um determinado limite. A APX é encontrada em diversos locais na célula incluindo o citosol, mitocôndria, cloroplastos e estroma no caso das suas isoenzimas solúveis, e nos peroxissomas e nos tilacoides dos cloroplastos no caso das isoenzimas membranares (Imahori, 2014).



Figura 9: Reação catalisada pela APX. Fonte: Afzal et al. (2014)

2.5.3.4. Monodesidroascorbato redutase

A monodesidroascorbato redutase (MDHAR) (EC 1.6.5.4.), é o maior constituinte do ciclo do ascorbato glutationa, e é altamente específica para o substrato monodesidroascorbato, que atua como um aceitador de elétrons, sendo o NAD(P)H o dador de elétrons (Fig.10), regenerando o ácido ascórbico. Esta enzima encontra-se localizada em diversos organelos da célula podendo ser encontrada nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias e nos peroxissomas (Afzal, et al., 2014).



Figura 10: Reação catalisada pela MDHAR. Fonte: Afzal et al. (2014)

2.5.3.5. Desidroascorbato redutase

A desidroascorbato redutase (DHAR) (EC 1.8.5.1.), utilizando a glutationa como agente redutor, vai reduzir o desidroascorbato a ascorbato (Fig.11), sendo uma peça importante do sistema antioxidante, mantendo o ácido ascórbico na sua forma reduzida. Tal como a MDHAR esta enzima encontra-se localizada em diversos organelos da célula podendo ser encontrada nos cloroplastos, citosol, mitocôndrias e nos peroxissomas (Afzal, et al., 2014).

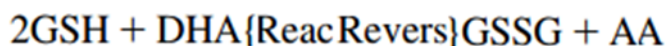


Figura 11: Reação catalisada pela DHAR. Fonte: Afzal et al. (2014)

2.5.3.6. Glutationa Redutase

A glutationa redutase (GR) (EC 1.6.4.2) é uma flavo-proteína oxirredutase que catalisa a redução da glutationa dissulfato (GSSG) em glutationa (GSH), utilizando o NADPH como agente redutor da reação (Fig.12). Esta enzima encontra-se maioritariamente nos cloroplastos, podendo também, embora em quantidades inferiores, ser encontrada nas mitocôndrias, citosol e peroxissomas (Yousuf, et al., 2012).



Figura 12: Reação catalisada pela GR. Fonte: Afzal et al. (2014)

2.5.4. Antioxidantes não-enzimáticos

2.5.4.1. Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (AA) é uma molécula que pode ser sintetizada pela maioria dos animais e plantas, e é o substrato redutor mais importante nas células vegetais para a eliminação do H_2O_2 (Noctor & Foyer, 1998). O AA pode ser encontrado na sua forma reduzida (AA) ou nas suas duas formas oxidadas (mono e/ou desidroascorbato), e o rácio entre a sua forma reduzida e oxidadas aparenta ser um fator determinante na resistência das plantas ao stress oxidativo (Wąskiewicz, et al., 2014). Para além da transformação do H_2O_2 em água, o ácido ascórbico também atua nas outras EROs, tanto diretamente como através do ciclo do ascorbato-glutationa, estando também envolvido noutros processos da planta como a fotossíntese, crescimento e desenvolvimento celular (Wąskiewicz, et al., 2014). Esta molécula pode ser encontrada nos diversos compartimentos das células, como os cloroplastos, mitocôndrias, e peroxissomas, em concentrações intermédias, e também nos vacúolos e paredes celulares em menores concentrações (Wąskiewicz, et al., 2014).

2.5.4.2. Glutationa

A glutathione (GSH) é um tripéptido com um papel extremamente importante no metabolismo das plantas, e apesar de não se encontrarem completamente elucidadas todas as suas funções, sabe-se que intervém em variados mecanismos de biossíntese relacionados com o crescimento, nomeadamente o desenvolvimento e diferenciação das células e a regulação de enzimas envolvidas na senescência (Afzal, et al., 2014). A GSH também protege a planta de agentes patogénicos e participa nos processos de eliminação de compostos químicos estranhos ao organismo (xenobióticos) bem como EROs como o 1O_2 , o H_2O_2 e OH^- (Afzal, et al., 2014). A GSH participa no ciclo do ascorbato-glutationa sendo utilizada pela enzima DHAR na redução do desidroascorbato a AA ocorrendo a sua oxidação com a formação da GSSG (Afzal, et al., 2014). A glutathione encontra-se maioritariamente nas mitocôndrias e cloroplastos, podendo estar presente também nos apoplastos e vacúolos das células em menores concentrações (Noctor, et al., 2012).

2.5.4.3. Polifenóis

Os compostos fenólicos formam uma das principais classes de metabolitos secundários que apresentam diversas estruturas e funções nos organismos das plantas, possuindo geralmente um anel aromático com um ou mais substituintes do grupo hidroxilo (Robards, et al., 1999). Estes metabolitos existem nos diversos tecidos e órgãos das plantas incluindo os seus frutos, surgindo no entanto com diferentes concentrações nos diversos locais em que se encontram presentes. Já ao nível das células estes compostos encontram-se maioritariamente nos vacúolos (Robards, et al., 1999). Os compostos fenólicos funcionam como agentes antioxidantes. Graças à sua estrutura química funcionam como doadores de eletrões, reduzindo assim as EROS a moléculas menos agressivas para os constituintes das células (Rice-Evans, et al., 1997; Robards, et al., 1999). Por ação da PPO, os compostos fenólicos podem ser oxidados, dando origem às o-quinonas que por sua vez se transformam nos pigmentos castanhos que vão surgir nos frutos durante o processo de acastanhamento.

2.5.5. Ciclo do ascorbato-glutationa (“Halliwell-Asada Pathway”)

O ciclo do ascorbato-glutationa (Halliwell-Asada Pathway) é um mecanismo que as plantas dispõem para a remoção das EROS geradas durante o seu metabolismo normal, ou quando surgem situações de stress (abiótico e/ou biótico) que possam desencadear uma desregulação na sua produção para níveis problemáticos à manutenção do bom funcionamento celular, levando ao designado stress oxidativo. No caso dos frutos que se encontram em armazenamento em AC esse stress oxidativo pode traduzir-se em desordens fisiológicas tais como o AI.

O ciclo constitui a primeira linha de defesa nos diferentes organelos da célula (cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas). A SOD catalisa a transformação dos radicais O_2^- em H_2O_2 e O_2 . Posteriormente, o H_2O_2 pode então ser degradado pela ação da CAT, formando O_2 e H_2O , ou então ser degradado pela ação da APX através oxidação do ascorbato em monodesidroascorbato (MDHA). Por sua vez, o MDHA pode voltar a ser convertido em ascorbato por ação da monodesidroascorbato redutase (MDHAR), ou então ser convertido rapidamente em desidroascorbato (DHA), sendo então transformado novamente em ascorbato pela enzima desidroascorbato redutase (DHAR), na presença da glutathione. Forma-se assim a GSSG, e ocorre a regeneração da glutathione por ação da enzima GR (Fig.13) (Latowski, et al., 2010).

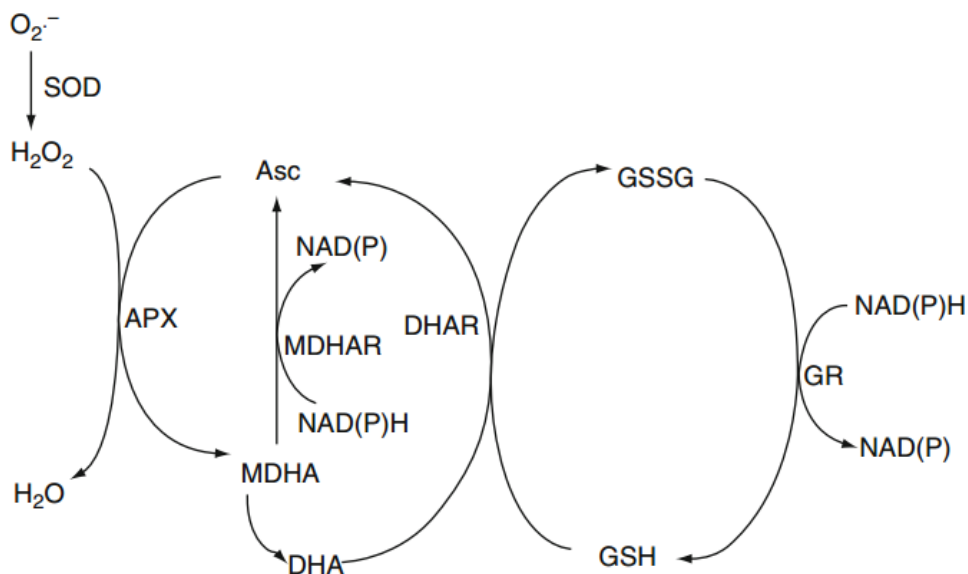


Figura 13: Ciclo do ascorbato-glutationa. Fonte: Latowski et al. (2010)

2.5.6. Metabolismo fermentativo

A função principal do metabolismo fermentativo é manter a produção de energia quando não é possível a realização da respiração aeróbia. Isto é possível através da utilização do NADH e do piruvato, fazendo com que a glicólise possa prosseguir, permitindo assim a sobrevivência temporária dos tecidos (Ke, et al., 1993). As condições de baixo oxigénio e/ou elevado dióxido de carbono presentes no armazenamento dos frutos, provoca diversas alterações no metabolismo dos frutos. Entre essas alterações verifica-se a descida nos níveis de ATP nos tecidos, bem como a acidificação do pH citoplásmico e uma redução da atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) (Ke, et al., 1993). Com a descida do pH e aumento dos níveis do piruvato e do NADH, dá-se a ativação da enzima piruvato descarboxilase (PDC) (Ke, et al., 1993). No metabolismo fermentativo podemos identificar duas vias de ação: (1) fermentação láctica, onde o piruvato pode ser reduzido a lactato através da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) que utiliza o NADH disponível (Ke, et al., 1993; Ke, et al., 1994); (2) a fermentação etanólica, em que o piruvato vai ser descarboxilado para formar acetaldeído através da PDC, e posteriormente a enzima álcool desidrogenase (ADH) vai converter o acetaldeído em etanol que geralmente é o produto principal da fermentação.

2.5.7. Enzimas metabolismo fermentativo

2.5.7.1. Piruvato Descarboxilase

A piruvato descarboxilase (PDC) (EC 4.1.1.1.), é uma enzima que se encontra em diversos fungos e plantas, sendo relativamente rara em procariotas (Fig.14) (Eram & Ma, 2013). Esta enzima é responsável pela descarboxilação do piruvato, formando acetaldeído, sendo ativada apenas aquando da descida do pH no citoplasma (Eram & Ma, 2013). Apesar da sua ligação crucial com o metabolismo fermentativo, Pintó et al., (2001) reportaram que a atividade desta enzima não diferia entre peras saudáveis e peras com acastanhamento durante o armazenamento em AC.

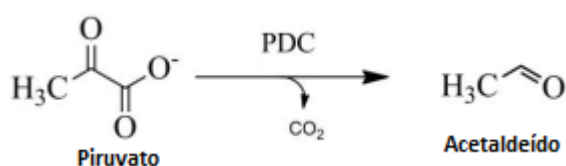


Figura 14: Reação catalisada pelo piruvato. Fonte: Eram & Ma (2013)

2.5.7.2. Álcool Desidrogenase

A enzima álcool desidrogenase (ADH) (EC 1.2.1.10) faz parte da família das oxirredutases que catalisam a reação reversível dos álcoois nas respetivas cetonas ou aldeídos, e são classificadas de acordo com o cofator necessário para reagirem (Fig.15) (Eram & Ma, 2013). Esta enzima atua após a formação do acetaldeído pela PDC, convertendo-o no produto principal da fermentação, o etanol. Pintó et al., (2001) reportaram que atividade desta enzima, ao contrário da PDC, duplicou em peras que tinham desenvolvido acastanhamento durante o armazenamento em AC, quando comparados com peras saudáveis.

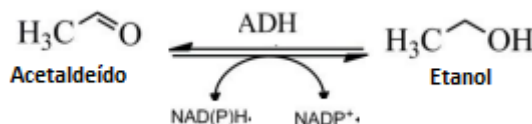


Figura 15: Reação catalisada pela ADH. Fonte: Eram & Ma (2013)

2.5.7.3. Metabolitos fermentativos

Durante o seu amadurecimento nas árvores e após a sua colheita e armazenamento, os frutos sofrem processos que vão envolver a produção de metabolitos fermentativos (Pesis, 2005). Estes metabolitos, nomeadamente acetaldeído e o etanol, em concentrações relativamente baixas, podem ser benéficos para o desenvolvimento do

sabor, ou como substratos para biosintetizar outros aromas característicos. O acetaldeído e o etanol também demonstraram ter a capacidade de atrasar a senescência e inclusivamente inibir a produção de etileno nas plantas, levando a uma redução dos sintomas provocados por baixas temperaturas. No entanto, segundo Ke et al. (1994) em elevadas concentrações, especialmente no caso de peras mais maduras, estes metabolitos fermentativos podem ser causadores de "off-flavours". Peras que tinham desenvolvido acastanhamento durante o armazenamento em AC, apresentavam valores destes metabolitos quase três vezes superiores aos frutos saudáveis, podendo colocar-se a hipótese que a citotoxicidade destes compostos possa estar ligada ao desenvolvimento do acastanhamento (Pintó, et al., 2001).

2.5.7.4. Acetaldeído

O acetaldeído (Fig.16) é um componente aromático natural, que se encontra presente em quase todos os frutos e para além do seu papel nas características organoléticas, possui também propriedades fungicidas e inseticidas. Este composto acumula-se durante o amadurecimento dos frutos sendo formado a partir do piruvato através da enzima piruvato descarboxilase. A acumulação dá-se especialmente quando estes se encontram em condições anaeróbicas (parcial ou totalmente), semelhantes às do armazenamento dos frutos em atmosfera controlada ou modificada (Pesis, 2005).

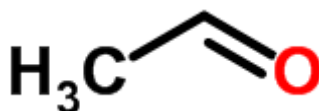


Figura 16: Acetaldeído. Fonte: Chemspider (2015)

2.5.7.5. Etanol

O etanol (Fig.17) é também uma substância que ocorre naturalmente nos frutos devido aos processos de fermentação e amadurecimento, resultando da ação da enzima ADH sobre o acetaldeído (Dudley, 2004; Pesis, 2005). Este composto tem efeitos variáveis nos diferentes tipos de frutos, entre os quais, a capacidade de inibir a maturação de tomate, aumentar a firmeza do melão quando injetado diretamente na sua cavidade das sementes, induzir a maturidade em figos e remover a adstringência em bananas e diospiros (Rinetour, et al., 1997; Pesis, 2005).



Figura 17: Etanol. Fonte: Chemspider

3. Material e métodos

Neste trabalho foram realizadas duas experiências. A experiência 1 teve como objetivo o estudo dos efeitos a curto prazo de elevadas concentrações de CO₂ no sistema antioxidante e metabolismo fermentativo da pera 'Rocha'. A experiência 2 teve como objetivo testar diferentes estratégias de armazenamento para prevenir a incidência do AI em pera 'Rocha', sujeitando os frutos a três tipos de tratamentos diferentes: (1) controlo ACI, (2) armazenamento dos frutos durante 21 dias em FN e subsequente armazenamento em ACI, (3) aplicação de 1-MCP, a uma concentração de 300 ppb.

3.1. EXPERIÊNCIA 1

Na primeira experiência os frutos foram colhidos num estado de maturação tardio, apresentando uma firmeza entre os 50-55 N, testado com um penetrómetro Magness Taylor 8 mm. Os frutos foram colhidos de um pomar (39° N 16' N, 98 W) Portugal, pertencente à cooperativa agrícola da região do Oeste, Coopval, do concelho do Cadaval. Em seguida os frutos foram armazenados em 2 tipos de condições atmosféricas diferentes durante 145 dias, nomeadamente: (1) atmosfera controlada normal (AC) (3% O₂ + 0.5% CO₂) simulando as condições atmosféricas de armazenamento comercial utilizadas atualmente para a pera 'Rocha'; (2) atmosfera indutora de AI (ACI) (1% O₂ + 10% CO₂) para acelerar o processo de formação de AI nos frutos durante o período experimental estipulado.

À colheita e a intervalos regulares durante o armazenamento (0, 45, 95, 125, 145 dias) foram preparadas amostras de polpa de pera mais próxima do caroço, usando 3 réplicas de 3 frutos cada, sendo congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C para posteriores análises bioquímicas, nomeadamente os níveis de ascorbato, H₂O₂ e da atividade das principais enzimas do sistema antioxidante (CAT, SOD, POX, PPO e APX). Também foram preparadas amostras de sumo de pera, utilizando 3 réplicas de 10 frutos para as determinações dos níveis dos metabolitos fermentativos, etanol e acetaldeído.

3.2. EXPERIÊNCIA 2

Na segunda experiência foram testadas duas estratégias de controlo do AI nos frutos. Os frutos foram colhidos num estado de maturação ótimo, apresentando uma firmeza entre os 60-65 N, testado com um penetrómetro Magness Taylor 8 mm, de outro pomar

(39° N 16' N, 98 W) Portugal, pertencente à cooperativa agrícola da região do Oeste, Coopval, do concelho do Cadaval. Em seguida os frutos foram transportados em condições de temperatura controlada para o Fruitcentre IRTA, localizado em Lleida (Espanha), onde foram testadas 3 modalidades de tratamento pós-colheita: (1) armazenamento em ACI, (2% O₂ + 10% CO₂) para acelerar o processo de formação de AI nos frutos durante o período experimental estipulado; (2) armazenamento em ACD, que consiste num período de conservação em FN (0°C, 95% HR) durante 21 dias sendo subsequentemente armazenados em ACI, testando-se se o período de aclimação dos frutos durante os primeiros 21 dias em FN pode influenciar ou não os níveis de AI; (3) aplicação de 1-MCP, a uma concentração de 312 ppb e posteriormente armazenados em ACI. Após 140 dias de armazenamento os frutos foram cortados e avaliados relativamente à percentagem de AI presente nos mesmos.

3.2.1. Metodologia analítica

3.2.2. Parâmetros de qualidade

Para a determinação do estado de maturação dos frutos à colheita foram avaliados 30 frutos relativamente aos seguintes parâmetros de qualidade: firmeza, peso médio por fruto, tonalidade (hue°), índice de regressão do amido, teor de sólidos solúveis (°Brix) e acidez titulável (g ácido málico/L). Foram também analisados o teor em sólidos solúveis e acidez titulável em sumos de pera preparados utilizando 10 frutos de cada tratamento. Todas as medições foram realizadas em triplicado.

A firmeza foi avaliada em lados opostos da fruta, após a remoção da casca, usando um penetrómetro manual (FT-327; TR Turoni, Forli, Itália) montado num suporte com alavanca e equipado com uma sonda de prova convexa de 8-mm de diâmetro. A determinação da cor da epiderme dos frutos foi medida em lados opostos de cada fruto com um colorímetro CR-400 (Konica-Minolta, Osaka, Japão), equipado com um iluminante D65 e um ângulo de observação de 2°, segundo o sistema de coordenadas CIE, L*, a*, b*. O equipamento foi calibrado com uma placa branca no início de cada uma das datas de observação das amostras. As coordenadas vetoriais ângulo de tonalidade (h°) e croma (C*) foram calculadas pelas equações $h^{\circ} = \arctan b^*/a^*$ e $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$, respetivamente.

Para a determinação da acidez titulável e teor de sólidos solúveis utilizaram-se 10 frutos não descascados, os quais foram cortados para fazer os sumos utilizando uma liquidificadora comercial. Foram preparados três sumos por cada amostra de 10 frutos. Os sumos foram filtrados através de um filtro de papel celulose e procedeu-se às análises da acidez titulável e teor de sólidos solúveis. O teor de sólidos solúveis foi

medido com um refratómetro digital (Atago PR-100, Tóquio, Japão). A acidez titulável foi determinada pela titulação de 25 ml de sumo com uma solução de NaOH 0,1 M até pH 8,1 de acordo com a norma NP EN 12147, sendo expressa em mmol H⁺/ml. O teor de amido foi determinado cortando os frutos transversalmente na zona equatorial por imersão da zona da polpa cortada numa solução de 1% (w/v) iodo e 4% (w/v) iodeto de potássio em água durante 1 minuto. Após o processo de imersão as amostras foram colocadas ao ar durante 10 minutos para secar. Finalmente o teor de amido em cada fruto foi avaliado por comparação com a escala de teor de amido desenvolvida para a variedade 'Rocha' (Avelar & Rodrigues, 1999).

3.2.3. Aplicação do 1-MCP

Os frutos destinados ao tratamento com 1-MCP, foram colocados em câmaras de refrigeração a -0.5°C. Após um dia de armazenamento nestas condições os frutos foram tratados usando o produto Smartfresh™ (AgroFresh Inc.) e seguindo as recomendações do fabricante.

Para o tratamento, os frutos foram colocados num saco de polietileno dentro do qual foi também colocado um frasco com a mistura de reação contendo 1-MCP na concentração de 312 ppb, de acordo com as recomendações atuais para a pera 'Rocha' (Carvalho et al., 2011), e de acordo com as instruções do fabricante. Para favorecer a difusão do 1-MCP e sua uniforme distribuição foi utilizado um pequeno ventilador junto ao frasco com a mistura de reação. O saco foi fechado de forma hermética sendo os frutos mantidos a -0.5°C durante 24 horas. Após o tratamento, o saco foi aberto e os frutos devidamente arejados, sendo posteriormente armazenados nas condições de ACI.

3.2.4. Estimativa de incidência e severidade do acastanhamento interno

Para a determinação da incidência e índice de severidade do AI foram selecionados aleatoriamente 60 frutos de cada estado de maturação e de cada tratamento após 0, 45, 95, 125, 145 dias de armazenamento. A incidência de AI foi estabelecida como a percentagem de frutos individuais afetados pelo número total de frutos avaliados. A severidade foi classificada considerando a extensão da zona afetado por AI de acordo com a escala: (0) saudável; (I) até 25% do fruto afetado; (II) moderado: 25-50% do fruto afetado; (III) > 50% do fruto afetado. O índice de severidade do acastanhamento foi calculado como descrito por Veltman et al., (1999).

3.2.5. Peróxido de hidrogénio

Para a extração foram utilizadas amostras de polpa fresca (15 g) sendo depois misturadas com um Ultra-Turraz (IKA Laboritechnik T 25, Staufen, Germany) juntamente com 20 mL de ácido tricloroacético a 5%. O homogenizado foi então centrifugado a 3857 x g durante 30 min a 4 °C e o restante sobrenadante foi utilizado para a determinação do H₂O₂ utilizando o Bioxytech H₂O₂-560 da OXIS International Inc. (Portland, OR USA) e seguindo as instruções do fabricante. Esta análise baseia-se na oxidação dos iões ferrosos (Fe₂₊) a iões férricos (Fe₃₊) pela ação do H₂O₂ num meio ácido. Os iões férricos vão juntar-se ao corante laranja xylenol formando um composto colorido estável que pode ser medido a 560 nm. Os níveis de H₂O₂ foram expressos em µmol g⁻¹ de peso fresco, e todos os procedimentos realizados a 4 °C e na ausência de luz.

3.2.6. Fenólicos

As amostras de polpa dos frutos (3 g de peso fresco) foram homogeneizadas com 15 mL de uma solução de metanol:HCL:H₂O, 79,5:0,5:20 (v/v/v) durante 2 horas a 250 rpm. O homogenizado foi então centrifugado a 3857 x g durante 30 minutos e depois o seu sobrenadante foi retirado para a determinação dos fenólicos.

A quantidade de fenólicos foi determinada através do método Folin–Ciocalteu (Obanda & Owuor, 1997). Foi preparada uma curva de calibração de ácido gálico (dos 50 até 1000 mg/L), como tal os resultados são apresentados em mg de ácido gálico por grama de peso fresco. Para a determinação dos fenólicos foram adicionados 50 µL do extrato, 250 µL do reagente fenólico Folin–Ciocalteu e 4,2 mL de água desionizada. Que depois misturados vigorosamente durante 5 min a 200 rpm, e foram adicionados à mistura 500 µL de Na₂CO₃ 20% (w/v) ficando a incubar durante 2 horas a 20 °C. Depois do período de incubação a microplaca foi preparada para a leitura a 765 nm do produto que apresenta uma cor azul.

3.2.7. Metabolismo Fermentativo

O etanol e o acetaldeído foram medidos de acordo com o método descrito por Ke et al. (1994) com algumas alterações. As amostras de sumo (10 ml) (3 réplicas de 10 frutos cada) foram preparadas e armazenadas a -25 °C até à sua análise. As amostras foram colocadas em tubos de 20 mL e incubados em água a 65 °C durante 1 hora, sendo retirado 1 mL da amostra para uma seringa de vidro para a determinação cromatográfica do etanol e acetaldeído. Utilizou-se um cromatógrafo (HP 5890 II, Hewlett Packard, EUA) equipado com uma coluna CP-WAX 57 CB chromepack (0.25 mm x 50 m x 0.2 µm, Agilent Technologies Inc., EUA) e um detetor de ionização de chama. As condições de operação foram as seguintes: temperatura do forno a 90°C, temperatura do injetor

250°C, temperatura do detetor de 220 °C. As concentrações de ambos os metabolitos fermentativos foram calculadas utilizando uma curva padrão obtida por injeção de soluções-padrão de concentrações conhecidas.

3.2.8. Ácido ascórbico e dehidroascórbico

As concentrações de (AA) e (DHA) foram determinadas como descrito por Zapata & Dufour (1992) com algumas adaptações. As amostras de polpa (10 g) foram homogeneizadas em 10 ml de metanol/água (5:95 v/v) e HCl (10 g/L) utilizando um Ultra-Turrax (modelo IKA Labortechnik T25, Staufen, Alemanha). O homogeneizado foi centrifugado a 5.000 rpm (Universal 320R, Hettich, Alemanha) durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de pregas. A 3 ml de extrato enzimático foi adicionado 1 ml de solução de dicloridrato de 1,2-fenilenodiamina (OPDA). A mistura foi incubada durante 30 a 40 minutos a 4°C e na obscuridade e posteriormente filtrada através de um filtro de 0,45 µm. Todos os procedimentos foram realizados na obscuridade a 4°C. As amostras foram analisadas com um sistema de HPLC equipado com um detetor de UV-Vis (UV-1575), um injetor automático (AS -1555) e uma bomba (PU -1580), todos controlados por software adequado (Borwin 1.5 v, Jasco Corporation, Tóquio, Japão). Para a separação do AsA e DHA foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS2 5 µm (250 x 4.6 mm da Waters Corporation, EUA). A fase móvel foi metanol/água (5:95, v/v) contendo 5 mM de cetrimida e 50 mM de dihidrogenofosfato de potássio. Durante as medições o fluxo foi mantido a 1,8 ml/min e o volume de injeção foi de 20 µl. O comprimento de onda do detetor foi fixado em 348 nm para a deteção do ácido dehidroascórbico (DHA) e 261 nm para deteção de L-ácido ascórbico (AsA). A concentração de ácido ascórbico foi expressa em mg.100 g⁻¹de peso fresco.

3.2.9. Extração de enzimas

Para a extração das enzimas do sistema antioxidante, nomeadamente, SOD, CAT, APX e a POX, 10 g de polpa de pera foram homogeneizados em 15 ml de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 7.3, ácido etilenodiamino-tetra-acético EDTA 1mM, 8% de glicerol 87% (v/v), PMSF 1mM, ácido ascórbico 5mM e 2% (w/v) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), utilizando um pilão e almofariz pré-arrefecidos. O homogeneizado foi centrifugado a 9591 xg (Thermo Scientific Heraeus X3FR, UK) durante 30 min a 4 °C sendo o sobrenadante resultante utilizado para a medição da atividade enzimática.

A extração da enzima (PPO) foi realizada de acordo com o método de Galeazzi & Sgarbieri (1981). As amostras da polpa (10 g) foram homogeneizadas em 10 mL de tampão fosfato de sódio 200 mM pH 6.5, 0.25% Triton X-100 (v/v) e 2% (w/v) de

polivinilpolipirrolidona (PVPP), usando um Ultra-Turrax (modelo IKA Labortechnik T 25, Staufen, Germany) durante dois minutos num banho gelado. O homogeneizado foi então centrifugado a 3857 x g (Universal 320R, Hettich, Germany) durante 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de duas camadas de gaze e utilizado como extrato enzimático.

3.2.10. Determinação do teor proteico

A determinação do teor proteico do extrato enzimáticos foi determinado com o kit Pierce Coomassie Plus Protein Assay, utilizando o método descrito por Bradford (1976) e seguindo as instruções do fabricante. O padrão utilizado no processo foi a albumina de soro bovino.

3.2.11. Medição da atividade enzimática

A atividade enzimática da APX foi determinada utilizando o método descrito por Nakano & Asada (1981). A mistura da reação consistiu num tampão de fosfato de potássio 100 mM e pH 7, ácido ascórbico 0,5 mM e de H₂O₂ 1mM. A atividade da APX foi medida usando um espectrofotómetro de UV-Vis (T80+, PG Instruments Ltd, Reino Unido) registando o declínio da absorvância a 290 nm provocado pela oxidação do ascorbato. A atividade da CAT foi medida através do método descrito por Claiborne (1985), acompanhando a oxidação do H₂O₂ a 240 nm durante 2 minutos numa mistura de reação contendo H₂O₂ 40 mM em tampão de fosfato de potássio de 100 mM pH 7.

A atividade da POX foi determinada através do método de Rao et al. (1996) com algumas alterações. A solução da reação consistiu em tampão de fosfato 100 mM, guaiacol 10 mM e H₂O₂ 10 mM. A atividade foi medida registando o aumento da absorvância devido à oxidação do guaiacol na presença do H₂O₂ durante 10 min a 470 nm.

A atividade da SOD foi determinada através do registo da sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do nitroblue tetrazolium (NBT) após a sua exposição durante 15 min a 560 nm usando quatro lâmpadas fluorescentes de 15 W (Giannopolitis & Ries, 1977). A solução da reação era constituída por tampão de fosfato 100 mM de pH 7.8, riboflavina (1,3 µM), metionina 13 mM e 122 µM NBT. As misturas com e sem a enzima foram iluminadas sendo as misturas controlo não iluminadas. Uma unidade de SOD foi considerada como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do NBT.

A atividade da PPO foi medida como descrito por Galeaazzi & Scarbieri (1981), sendo o tampão de extração constituído por catecol 200mM e tampão de fosfato de sódio 200 mM pH 6.5. A medição da atividade foi feita durante 3 min a 420 nm.

Exceptuando a SOD, a atividade enzimática foi expressa como a alteração da densidade ótica por mg de proteína em $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

3.2.12. Análise Estatística

A análise dos dados e a análise da variância (ANOVA) foram realizadas utilizando o programa IBM SPSS Statistics, versão 21.0. (Armonk, NY: IBM Corp.). A análise da variância e dos efeitos da atmosfera para os dados do armazenamento foram feitos utilizando o General Linear Model regression (GLM). A comparação das médias foi feita através do teste de Tukey Honestly Significant Difference (HSD) para um valor de $P=0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. EXPERIÊNCIA 1

Nesta primeira experiência, pretendeu-se aprofundar o estudo dos fatores que influenciam o metabolismo dos frutos durante o seu armazenamento e compreender qual o seu efeito, nos mecanismos bioquímicos envolvidos na ocorrência e desenvolvimento do AI.

4.1.1. Parâmetros de qualidade à colheita

Para determinar o estado de maturação dos frutos à colheita foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos: firmeza, peso, tonalidade, índice de regressão de amido, teor de sólidos solúveis (TSS) e acidez total titulável (ATT) (Tabela 3). Com base nos dados relativos a estes parâmetros, é possível determinar o estado de maturação ótimo em que os frutos devem ser colhidos.

Tabela 3- Firmeza, peso médio por fruto, tonalidade (hue°), índice de amido, teor de sólidos solúveis (°Brix), acidez total titulável (g ácido málico/L) e rácio teor de sólidos solúveis/acidez titulável (TSS) /AT) de peras de um pomar colhidos no estado de maturação tardio.

Estado Maturação	Firmeza (N)	Peso (g)	Tonalidade (hue°)	Índice regressão amido	Teor Sólidos Solúveis (°Brix)	Acidez total titulável (g ácido málico/L)	TSS /AT
Tardio	53,8± 0,6	165 ± 28,9	107,2±2,74	8 ±1,4	12,9±0,1	1,31±0,02	0,66

Os principais fatores utilizados na definição da data de colheita são a firmeza e o TSS. A firmeza, vai diminuindo ao longo da maturação dos frutos, o que faz com que percam a sua resistência aos danos mecânicos provocados pelo manuseamento pós-colheita. Já o TSS, vai apresentar uma evolução positiva com a progressão do estado de maturação dos frutos, devido à conversão do amido em açúcares simples. Na Tabela 3, podemos observar que os frutos se encontram num estado de maturação tardio, uma vez que apresentam valores de firmeza e acidez abaixo dos recomendados à colheita (55 e 65N e 2-3 g ácido málico/L, respetivamente) e um TSS no limite das indicações aceitáveis para a sua colheita no estado ótimo (11-13 ° Brix) (ANP, 2013).

4.1.2. Avaliação da incidência do acastanhamento interno

Na Fig. 18A observa-se que durante todo o armazenamento os valores de incidência de AI nos frutos em ACI, são sempre superiores quando comparados com os frutos ACN.

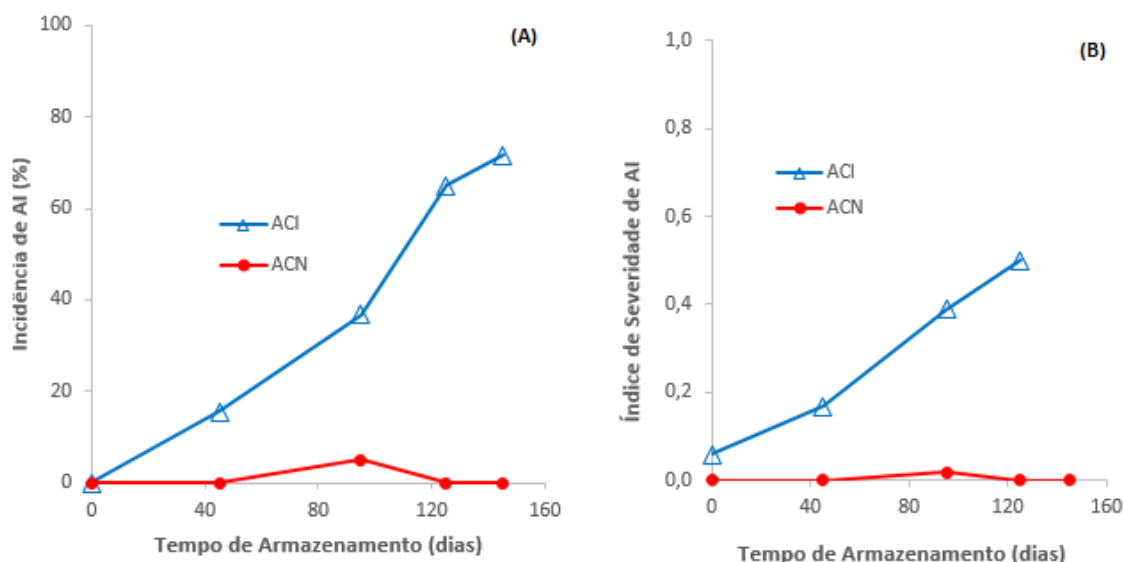


Figura 18- Incidência de acastanhamento interno (A) e índice de severidade de acastanhamento interno (B) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O₂ + 0.5% CO₂) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O₂ + 10% CO₂).

Nos frutos armazenados em ACI a incidência e a severidade do AI aumentaram progressivamente ao longo do armazenamento, entre os 95 dias e os 125 dias a incidência aumentou cerca de 28%, sendo que no final do armazenamento a incidência de AI nestes frutos atingiu os 71,7%. No caso dos frutos em ACN sucedeu-se o oposto, onde o valor máximo de frutos com AI chegou apenas aos 5% após 95 dias de armazenamento, seguindo a partir daí uma tendência negativa até ao fim do armazenamento. Na Fig.18B podemos observar que a severidade segue a mesma tendência presente na figura anterior, atingindo no final do armazenamento um índice de 0,5 nos frutos armazenados em ACI. Os resultados permitem concluir que a alteração dos níveis de CO₂ e O₂ durante o armazenamento em AC tem um efeito bastante significativo nos frutos, levando a um aumento da percentagem de incidência de AI bem como o aumento da sua severidade nos frutos afetados (Veltman, 2002). O armazenamento dos frutos da ACN (3% O₂+ 0,5% de CO₂), pelo contrário, aparenta ser adequado para o armazenamento de frutos colhidos num estado de maturação tardio neste período de tempo (145 dias). Estes resultados estão de acordo com os reportados noutros estudos realizados com esta cultivar. Guterres (2013) reportou resultados semelhantes para os frutos armazenados num estado de maturação tardio e Silva

(2006) mostrou que a incidência de AI surgiu somente após 236 dias de armazenamento em frutos armazenados em condições de de ACN.

4.1.3. Níveis de ácido ascórbico e rácio DHA/AA

O ascorbato tem um papel extremamente importante na eliminação das EROs, atuando como peça central no ciclo ascorbato-glutationa presente no sistema antioxidante dos frutos (Pintó, et al., 2001). Na Fig. 19A, todos os valores da concentração do ascorbato apresentaram diferenças significativas entre as duas atmosferas. Os valores em ambas as atmosferas vão decrescendo continuamente ao longo do armazenamento, com uma descida acentuada logo após a colheita e até atingir os 45 dias de armazenamento. Aos 45 dias os frutos em ACI (1,1 mg/100 g PF), demonstraram numa descida de cerca de 60% relativamente ao valor à colheita (2,69 mg/100 g PF), já para os frutos em ACN a descida foi de 46% (1,46 mg/100 g PF) quando comparado com os valores obtidos à colheita. Esta descida na concentração do AA manteve-se até ao final do armazenamento, atingindo os 0,58 mg/100 g PF para os frutos em ACI, e 0,94 mg/100 g PF para os frutos em ACN. Traduzindo-se numa descida na concentração de AA de cerca de 79% para os frutos em ACI e 65% para os frutos em ACI no fim do armazenamento face ao valor à colheita.

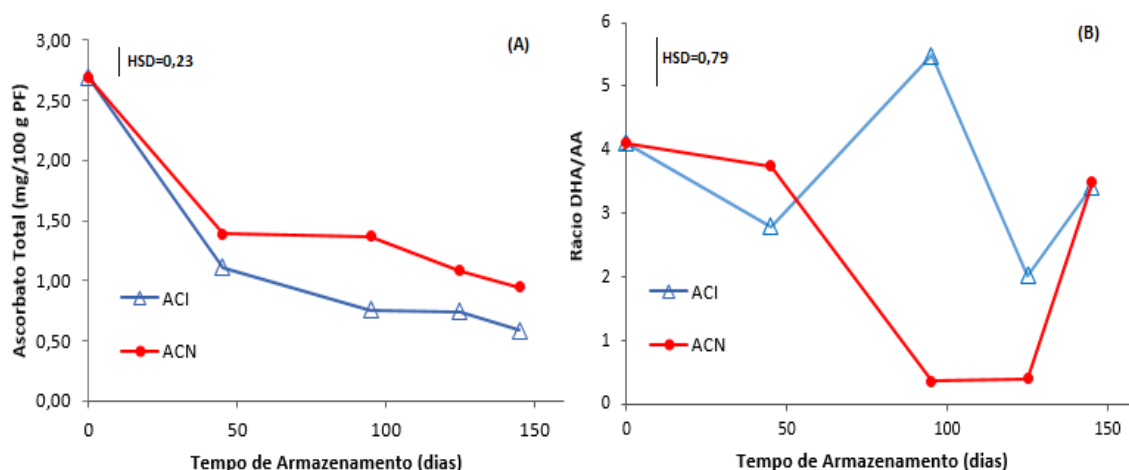


Figura 19- Concentração de ácido ascórbico (A) rácio DHA/AA (B) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O₂ + 0.5% CO₂) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O₂ + 10% CO₂). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a P=0.05.

Estes resultados são semelhantes aos reportados em peras por Veltman et al. (2000) e Franck et al. (2003), e também em maçã por Castro et al. (2008), onde os níveis de ascorbato demonstraram um decréscimo nos frutos armazenadas tanto em ACN como ACI. Estes resultados sugerem que caso os níveis de ascorbato atingissem um valor mínimo, dependente da cultivar em causa, fosse despoletado o surgimento do AI. Estas

observações parecem ir de encontro com o que Veltman (2002) constatou num ambiente *in vitro*, relatando que o AA tem a capacidade de regenerar as o-quinonas, conseguindo revertê-las em polifenóis, evitando a polimerização dos pigmentos castanhos e potencialmente o aparecimento dos sintomas de AI. Na Fig. 19B todos os valores apresentaram diferenças significativas entre as duas atmosferas à exceção dos 145 dias. Podemos observar, que o rácio nos frutos em ACN sofreram uma descida abrupta após os 45 dias de armazenamento, atingindo o seu valor mais baixo aos 95 dias de armazenamento (0,36), mantendo valores semelhantes aos 125 dias (0,41), no entanto aos 145 dias de armazenamento sofreram uma subida para valores semelhantes aos frutos em AC indutora (3,43 para os frutos em ACN e 3,49 para os frutos em ACI). Resultados semelhantes foram obtidos em maçãs 'Pink Lady' por Castro et al. (2008), onde os frutos que apresentavam acastanhamento após 2 meses de armazenamento em AC, também revelaram uma maior concentração de DHA aliada ao decréscimo da concentração do AA. Estes resultados poderão ser explicados pela reação de oxidação do DHA pela ação do H_2O_2 , interferindo com a capacidade de regeneração do AA no ciclo ascorbato-glutationa, e provocar uma diminuição dos níveis de AA total (Deutsch, 1998).

4.1.4. Níveis do peróxido de hidrogénio

O H_2O_2 é produzido durante vários processos celulares e aparenta estar ligado aos processos de maturação e senescência dos frutos. O H_2O_2 é produzido durante a atividade da SOD e funciona como substrato para as diversas enzimas do sistema antioxidante (Brennan & Frenkel, 1977; Lurie, 2003). Como podemos observar na Fig.20 os níveis de H_2O_2 vão decrescendo ao longo do armazenamento tanto para os frutos em ACN como os frutos em ACI, sofrendo ambos uma queda acentuada após os 45 dias (33,7 $\mu\text{mol/kg PF}$ para os frutos em ACI e 35,7 $\mu\text{mol/kg PF}$ para os frutos em ACN), perdurando até aos 95 dias de armazenamento (8,6 $\mu\text{mol/kg PF}$ para os frutos em ACI e 23,1 $\mu\text{mol/kg PF}$ para os frutos em ACN). Todos os valores apresentaram diferenças significativas para as duas atmosferas excetuando nos frutos representados aos 45 dias de armazenamento.

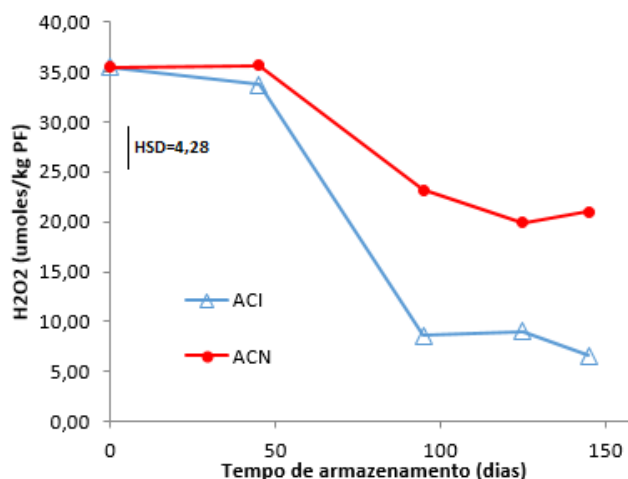


Figura 20-Concentração de peróxido de hidrogénio em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O₂ + 0.5% CO₂) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O₂ + 10% CO₂). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a P=0.05.

Aos 95 dias de armazenamento os frutos armazenados em ACI demonstram uma descida de 77,2% face aos níveis de H₂O₂ à colheita. Já os frutos em ACN revelam uma descida de aproximadamente 34,7%, face aos valores à colheita de H₂O₂. Esta tendência mantém-se até aos 145 dias de armazenamento, onde os frutos armazenados em ACI, atingem valores três vezes inferiores quando comparados com os frutos armazenados em ACN (6,61 μmol/kg PF vs. 21,04 μmol/kg PF). Segundo Larrigaudière et al. (2001) foi observada uma tendência semelhante nos níveis de H₂O₂ em peras armazenadas durante 30 dias em AC (2% O₂ e 5% CO₂). Um comportamento semelhante também foi observado em pera 'Blanquilla' e maçãs 'Golden Smothee' armazenadas em condições de frio normal, apresentando um pico na concentração de H₂O₂ no início do armazenamento, seguido depois de uma descida constante até ao fim do armazenamento dos frutos (Larrigaudière, et al., 2004; Larrigaudière, et al., 2006). Os resultados obtidos nesta experiência nos frutos armazenados em ACI, podem ser explicados pelos níveis de atividade inferiores relativos à enzima SOD (Fig. 21A), levando à diminuição da formação de H₂O₂ através de outras EROs mais reativas. Este fator, aliado à atividade superior da CAT (Fig. 21B) nos frutos em ACI, que é uma das enzimas responsáveis pela remoção do H₂O₂, pode explicar a diminuição da concentração do H₂O₂ durante o armazenamento, especialmente nos frutos armazenados em ACI. Como acima mencionado, na secção referente ao AA, esta tendência também poderá ser explicada pela reação de oxidação do DHA na presença de H₂O₂, consumindo-o e consequentemente provocar a descida da concentração do H₂O₂ nos frutos (Deutsch, 1998).

4.1.5. Enzimas antioxidantes

A atividade antioxidante dos frutos para além de se encontrar intimamente associada à presença de substâncias antioxidantes como o AA, também depende de enzimas como a SOD a CAT e a APX, que são responsáveis pela eliminação das EROs presentes nos frutos (Larrigaudière, et al., 2004). O equilíbrio no funcionamento entre estas enzimas nas células, é essencial para a manutenção dos níveis dos radicais de superóxido e H_2O_2 , prevenindo reações que possam levar à formação de radicais ainda mais tóxicos que possam colocar em risco o bom funcionamento do organismo (Mittler, 2002). Como se pode observar na Fig. 21A as diferenças foram significativas entre as duas atmosferas durante todo o período de armazenamento. A atividade da SOD nos frutos armazenados em ACN foi mais elevada do que nos frutos armazenados em ACI durante todo o período de armazenamento atingindo o seu valor máximo aos 125 dias (78,1 Ua/mg proteína). Já os frutos em ACI sofreram uma descida constante na atividade enzimática, apresentando no final do armazenamento (53,2 Ua/mg proteína) uma descida de aproximadamente 22% face à atividade registada na colheita (68,4 Ua/mg proteína). Segundo Larrigaudière et al. (2004) uma maior atividade da SOD geralmente indica uma maior capacidade de resistência ao stress, isto porque o papel da SOD é degradar o superóxido em H_2O_2 , evitando a acumulação de EROs mais reativas nas células. Explicando assim a maior atividade presente nos frutos em ACN do que nos frutos em ACI. Estes resultados também se encontram de acordo com o reportado por Pintó et al. (2001), onde as peras 'Blanquilla' armazenadas em ACI (2% O_2 e 5% CO_2) que apresentavam acastanhamento, também demonstravam menor atividade na SOD quando comparados com frutos saudáveis.

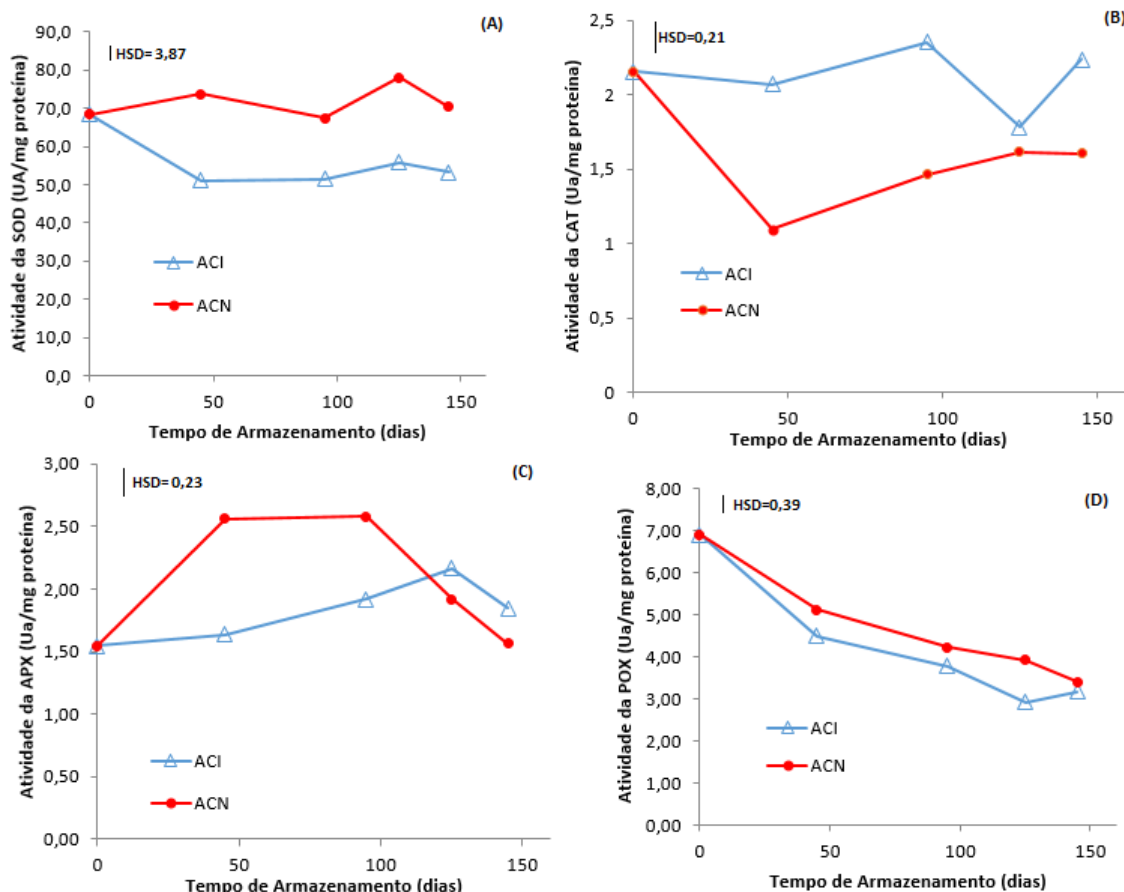


Figura 21- Atividade da SOD (A), CAT (B), APX (C) e POX (D) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal (3% O₂ + 0.5% CO₂) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O₂ + 10% CO₂). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a P=0.05.

Na Fig.21B relativa aos níveis de atividade da CAT, todos os valores apresentaram diferenças significativas entre as duas atmosferas à exceção dos valores apresentados aos 125 dias. Os níveis de atividade da CAT foram sempre superiores nos frutos armazenados em ACI, tendo atingido o seu valor mais elevado (2,35 Ua/mg proteína) aos 95 dias. Já no caso dos frutos em ACN, estes sofreram uma descida abrupta até aos 45 dias de armazenamento (1,09 Ua/mg proteína), subindo depois de forma constante até aos 145 dias (1,6 Ua/mg proteína). Traduzindo-se no fim do armazenamento, numa descida de 25,6% face ao valor de atividade observado à colheita. A CAT juntamente com as restantes enzimas do sistema antioxidante, é responsável pela eliminação do H₂O₂ nas plantas, evitando assim, potenciais danos provocados pela sua acumulação no organismo. A atividade superior da CAT no caso dos frutos em ACI, pode ser explicada pela sua independência relativamente ao oxigénio, tornando-a na enzima preferencial para a limpeza do H₂O₂ em condições de baixa energia. Liu et al. (2012) reportou uma tendência semelhante na CAT em peras armazenadas em alto CO₂ (2% CO₂), revelando também um aumento significativo da atividade da CAT no início do armazenamento (dois meses) observando depois um

declínio na sua atividade. Já Pintó et al. (2001), verificou uma descida geral na atividade da CAT durante os 6 meses de armazenamento dos frutos em ACI (2% O₂ e 5% CO₂) quando comparado com valores de atividade à sua colheita.

Na Fig.21C, encontramos os dados relativos à atividade da APX, onde todos os valores revelaram diferenças significativas entre as duas atmosferas durante todo o período de armazenamento. Os frutos em ACN demonstraram níveis de atividade superior aos frutos em ACI, estabilizando a sua atividade entre os 45 (2,56 Ua/mg proteína) e os 95 dias (2,58 Ua/mg proteína), sofrendo depois uma descida até ao final do armazenamento. Pelo contrário, os níveis de atividade nos frutos em ACI foram subindo gradualmente até aos 125 dias (2,17 Ua/mg proteína) onde atingiram um pico de atividade, ultrapassando assim os frutos em ACN até ao final do armazenamento. A APX também é uma das enzimas responsáveis pela limpeza do H₂O₂ nos frutos, sendo considerada a enzima com maior afinidade para o H₂O₂ no sistema antioxidante. Esta cataliza a redução do H₂O₂ através do ascorbato, que volta a ser regenerado durante o ciclo do ascorbato-glutationa (Lurie, 2003). No entanto, em condições de baixa energia, como se sucede no caso dos frutos armazenados em ACI, a sua atividade é diminuída, o que aliado à capacidade de atuação superior da CAT em condições de hipoxia, vai eliminar o H₂O₂ primeiro, e reduzir assim o substrato disponível para a APX. Isto poderá explicar a redução no seu nível de atividade quando comparado com os frutos em ACN. Pintó et al., (2001) reportou para o caso da pera 'Blanquilla' armazenada em ACI, que houve um aumento da atividade na APX quando comparado com os valores à colheita. Uma tendência semelhante também foi descrita por Larrigaudière et al. (2004) em peras armazenadas em condições controladas (-0,5°C e 90% HR) onde a atividade da APX também sofreu uma subida inicial até próximo dos 60 dias, e depois uma descida ligeira até ao final dos 150 dias de armazenamento.

Na Fig. 21D encontram-se apresentados os dados relativos à atividade da enzima POX, apresentando diferenças significativas entre todos os valores das duas atmosferas à exceção dos 145 dias. O gráfico apresenta uma tendência decrescente nos frutos de ambas atmosferas, demonstrando no fim do armazenamento menos de metade dos valores da atividade enzimática apresentada à colheita. No entanto, é de notar que os frutos armazenados em ACN apresentam valores superiores durante todo o armazenamento. A POX também metaboliza o H₂O₂ presente nos frutos, no entanto ao fazê-lo pode provocar a oxidação dos dadores de hidrogénio, incluindo os polifenóis, podendo a sua atividade encontrar-se relacionada com acastanhamento interno. Estes resultados obtidos poderão ser explicados pela escassez de substrato para a POX, nomeadamente o H₂O₂, devido ao funcionamento das outras enzimas do sistema

antioxidante, provocando diminuição do H_2O_2 e consequentemente a atividade da POX durante o armazenamento. Resultados semelhantes foram reportados por Larrigaudière et al., (2004) em peras armazenadas em condições controladas ($-0,5^{\circ}C$ e 90% HR) revelando também uma tendência decrescente na atividade da POX ao longo do armazenamento. Um comportamento semelhante também foi observado em maçãs armazenadas em AC ($1,25\% O_2$ e $0,5\% CO_2$) a diferentes temperaturas ($0^{\circ}C$, $4^{\circ}C$ e $8^{\circ}C$) demonstrando uma tendência decrescente logo após a sua colheita e até ao fim dos 205 dias de armazenamento (Ingham, et al., 1998).

4.1.6. Níveis da atividade da PPO e concentração de fenólicos

A enzima PPO é responsável pela oxidação dos compostos fenólicos, que por sua vez podem ser polimerizados nos pigmentos castanhos característicos presentes nos frutos que sofreram acidentes fisiológicos (Richard-Forget & Gaillard, 1997). Para além de ser catalisados pela PPO, os fenólicos também demonstraram possuir capacidades antioxidantes (Tanrioven & Eksi, 2005), pelo que a monitorização destes fatores é extremamente importante no estudo do AI. Na Fig. 22A pode-se observar que todos os valores relativos à atividade da PPO apresentaram diferenças significativas entre as duas atmosferas. Tanto os frutos armazenados em ACN como em ACI, demonstraram no fim dos 145 dias de armazenamento um aumento na atividade enzimática (em 30% e 43%, respetivamente), embora a atividade da PPO nos frutos em ACI tenha sido sempre superior durante todo o período de armazenamento, quando comparados com os frutos em ACN.

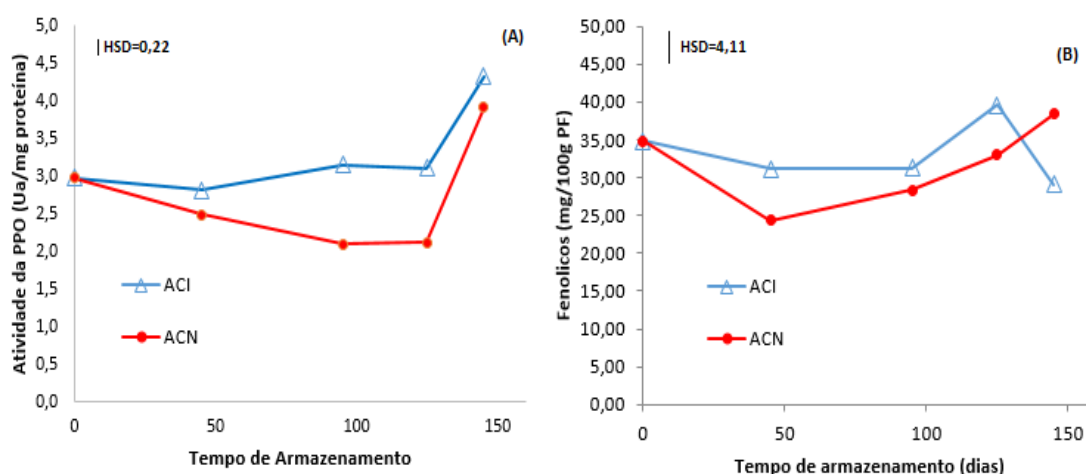


Figura 22-Atividade da PPO (A) e da concentração dos fenólicos (B) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal ($3\% O_2 + 0,5\% CO_2$) e armazenamento em atmosfera controlada indutora ($1\% O_2 + 10\% CO_2$). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a $P=0,05$.

Estes resultados sugerem que a atividade superior da PPO nos frutos em ACI poderá estar relacionada com o aumento da ocorrência e desenvolvimento de AI na pera 'Rocha' já que esta enzima é responsável pela oxidação dos compostos fenólicos, que podem dar origem aos pigmentos castanhos que surgem nos frutos afetados. No entanto, o mesmo não foi observado por outros autores relativamente a outras cultivares. Veltman et al. (1999), reportou no caso das peras 'Conference', colhidas num estado de maturação tardio e armazenadas em condições indutoras semelhantes a este estudo (2% O₂ e 3% CO₂), que não foram verificadas diferenças na actividade da PPO entre os frutos armazenados em ACI e em ACN. Larrigaudière et al. (1998) também não identificou diferenças significativas em peras 'Conference' armazenadas em ACN, comparativamente a peras armazenadas em baixas concentrações de oxigénio (1% O₂ e 0,7% CO₂), no entanto observou o aumento na atividade da PPO durante todo o período de armazenamento. Na Fig. 22B também se observaram valores de compostos fenólicos significativamente superiores nos frutos armazenados em ACI (à exceção dos 95 dias de armazenamento), tendo-se atingido um pico aos 125 dias (39,6 mg/100g PF) seguido de uma descida quando atingidos os 145 dias de armazenamento (29,1 mg/100g PF). No caso dos frutos armazenados em ACN, estes sofrem uma descida na concentração até aos 45 dias (24,38 mg/100g PF), subindo depois de forma constante, até atingirem o seu valor máximo aos 145 dias de armazenamento (38,42 mg/100g PF). A descida presente na concentração dos fenólicos após os 125 dias de armazenamento nos frutos em ACI poderá ser explicada pelo aumento da atividade da PPO provocando a degradação dos fenóis através da sua oxidação direta por parte da enzima (Amiot, et al., 1995). No entanto, a variação dos fenólicos não depende exclusivamente da atividade da PPO, podendo estes ser oxidados por outras vias e até biossintetizados pelas próprias células (Awad & Jager, 2003). Resultados semelhantes foram reportados por Amiot et al. (1995), onde peras de diversas cultivares, armazenadas em condições de alto CO₂ (3%) durante dois meses, apresentaram uma descida na sua concentração total de fenólicos quando comparados com frutos armazenados ao ar e em concentrações de CO₂ mais baixas (1%). No entanto, Awad & Jager (2003) reportaram uma descida da concentração dos fenólicos em maçã 'Granny Smith' tanto para as que foram armazenadas ao ar, como as armazenadas em ACN (1% O₂ + 2% CO₂), diminuindo a partir dos 100 dias de armazenamento até ao final do armazenamento.

4.1.7. Níveis dos metabolitos fermentativos

O etanol e acetaldeído são produtos do metabolismo fermentativo, acumulando-se nas células em condições de baixo O_2 , como se sucede no caso dos frutos armazenados em AC. Estes metabolitos, quando se encontram a níveis acima dos tolerados pelos frutos podem tornar-se tóxicos podendo estar relacionados com os mecanismos relativos ao aparecimento do AI nos frutos (Chervin, et al., 1996; Pintó, et al., 2001). Na Fig.23A podemos observar que a concentração do etanol nos frutos armazenados em ACI sofreu um aumento substancial ao longo de todo armazenamento atingindo após os 95 dias (90,1 ppm) um crescimento exponencial que se manteve até ao final do seu armazenamento onde se verificou o seu valor mais elevado (298,35 ppm).

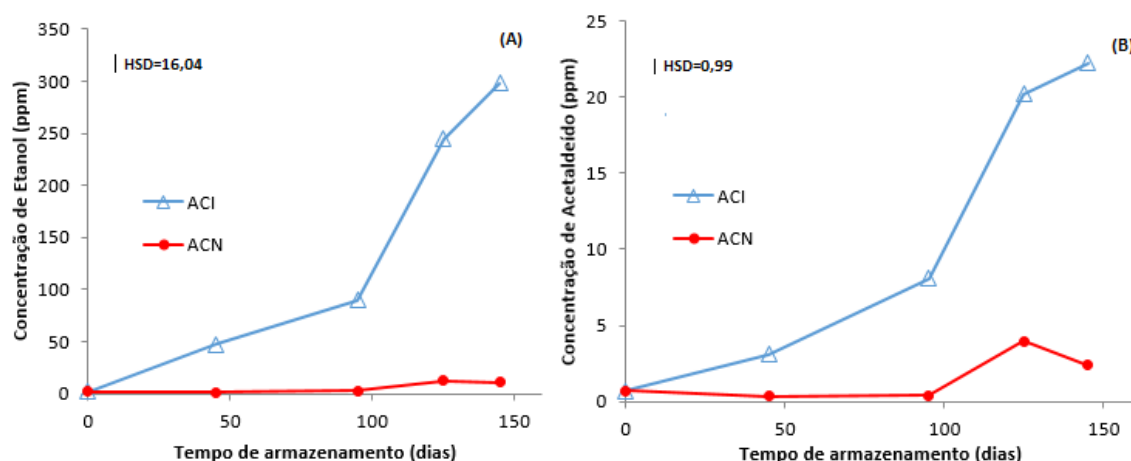


Figura 23- Concentração de etanol (A) e acetaldeído (B) em peras no estado de maturação tardio, durante o armazenamento em atmosfera controlada normal CO_2 (3% O_2 + 0.5% CO_2) e armazenamento em atmosfera controlada indutora (1% O_2 + 10% CO_2). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada. Barras verticais representam Tukey's HSD a $P=0.05$.

Já no caso dos frutos armazenados em ACN, as concentrações destes metabolitos mantiveram-se quase nulas até aos 95 dias (3,01 ppm), subindo ligeiramente até ao fim do armazenamento (11,5 ppm). Na Fig.23B podemos observar que os níveis de acetaldeído seguem uma tendência semelhante à anteriormente descrita para o etanol. Como tal, os frutos armazenados em ACI apresentam uma concentração muito superior aos frutos de ACN, verificando-se um aumento exponencial a partir dos 95 dias (8,1 ppm), até ao final dos 145 dias de armazenamento (22,22 ppm), quase triplicando os valores da sua concentração. No caso dos frutos em ACN as concentrações de acetaldeído mantiveram-se constantes até aos 95 dias de armazenamento, sofrendo apenas um pico na sua concentração aos 125 dias (3,98 ppm) e terminando com uma descida aos 145 dias (2,39 ppm). Em estudos anteriores já se havia verificado que o aumento dos metabolitos fermentativos estava correlacionado com o aumento do AI em

pera 'Rocha' (Deuchande et al. 2012), bem como para a pera 'Blanquilla' (Larrigaudière et al, 2004). Os resultados obtidos nesta experiência também se encontram em linha com os dados obtidos por Guterres (2013) em pera 'Rocha' armazenada em ACI (1% O₂ e 10% CO₂), e por Pintó et al. (2001) em pera 'Blanquilla' armazenada em ACI (2% O₂ e 5% CO₂) e em ACN (2% O₂ e 0,3%CO₂) levando ao aumento dos metabolitos fermentativos, especialmente nos frutos com maior taxa de incidência de AI.

4.2. EXPERIÊNCIA Nº2

Nesta experiência 2, o objetivo foi procurar respostas para a prevenção e desenvolvimento do AI, na pera 'Rocha'. Testando estratégias de controlo alternativas aos métodos de conservação atuais, por forma a evitar o surgimento de acidentes fisiológicos durante o armazenamento desta cultivar.

4.2.1. Parâmetros de qualidade à colheita

A análise do estado de maturação dos frutos foi realizada imediatamente após a sua colheita. De acordo com os dados da Tabela 4, podemos observar que os frutos se encontravam num estado de maturação ótimo, apresentando valores relativos à firmeza (64,8N) dentro dos valores de referência (55-65 N), o peso (138g) ligeiramente acima do valor de referência para uma pera de calibre médio (130g). O teor de sólidos solúveis (10,4 ° Brix) apresentava-se ligeiramente abaixo do intervalo recomendado (11-13 °Brix), sucedendo-se o mesmo para o caso da acidez total titulável (1,88 g ácido málico/L), quando comparado com os valores de referência para esta cultivar (2-3 g ácido málico/L) (ANP, 2013).

Tabela 4- Firmeza, peso médio por fruto, tonalidade (hue°), índice de amido, teor de sólidos solúveis (°Brix), acidez total titulável (g ácido málico/L) e rácio teor de sólidos solúveis/acidez titulável (TSS /AT) de peras de um pomar colhidas no estado de maturação ótimo.

Estado Maturação	Firmeza (N)	Peso (g)	Tonalidade (hue°)	Índice regressão amido	Teor Sólidos Solúveis (°Brix)	Acidez total titulável (g ácido málico/L)	TSS/A T
Ótimo	64,8± 5,4	138 ± 32	109,9±2,4	5,1 ±1,3	10,4±0,1	1,88±0,04	0,37

4.2.2. Avaliação da incidência do acastanhamento interno

A incidência de acastanhamento foi avaliada após os 140 dias de armazenamento, em frutos cortados longitudinalmente e avaliados visualmente quanto à incidência de AI e índice de severidade nos frutos afetados. Na Fig.24A podemos observar que os frutos armazenados em ACD foram os que apresentaram os maiores níveis de AI entre todos os tratamentos (23,0%), seguidos dos frutos armazenados em ACI (14,8%) e finalmente dos frutos tratados com 1-MCP (3,3%).

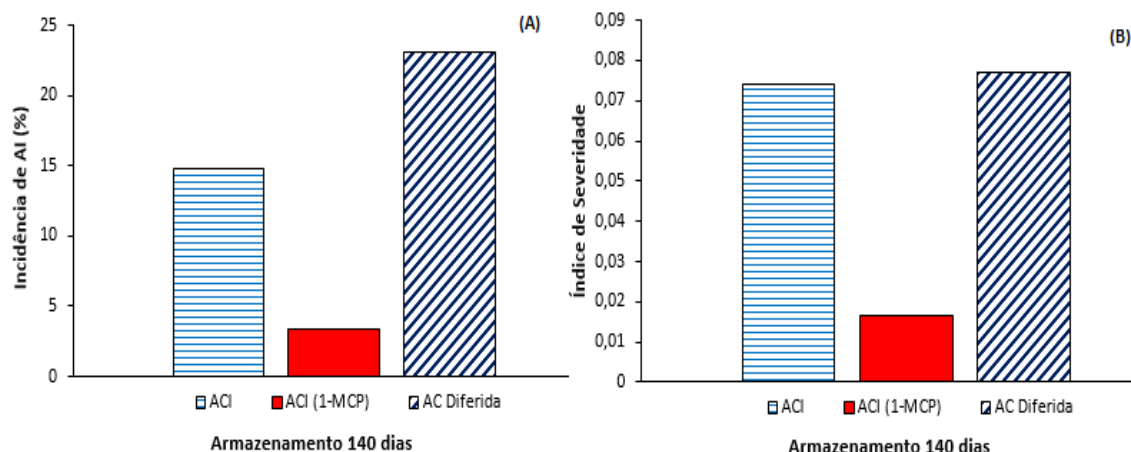


Figura 24-Incidência de acastanhamento interno (A) e índice de severidade de acastanhamento interno (B) em peras no estado de maturação ótimo, durante o armazenamento em atmosfera controlada indutora (2% O₂ + 10% CO₂), com tratamento de 312 ppb 1-MCP e armazenamento em atmosfera controlada indutora e atmosfera controlada diferida (21 dias Frio normal+ ACI).

Quanto ao índice de severidade do AI, este mantém a mesma tendência acima indicada, com os frutos armazenados em ACD a apresentar os maiores níveis de severidade (0,076), seguidos dos frutos em ACI (0,074) e por fim os frutos tratados com 1-MCP onde se verificou um índice muito inferior (0,016) (Fig. 24B). Estes resultados demonstram que a aplicação do 1-MCP contribuiu para a redução da incidência de AI em pera 'Rocha', mesmo em condições de ACI, diminuindo a incidência de AI em 4,5 vezes quando comparado com os frutos não tratados e aproximadamente 7,6 vezes menos, quando comparado com os frutos do tratamento em ACD. Os efeitos positivos do 1-MCP na prevenção do AI na pera 'Rocha', colhida num estado de maturação ótimo, durante um período de 6 meses de armazenamento, em ACN (3% O₂ e 0,7% CO₂), já tinha sido anteriormente demonstrados por Carvalho (2011). Paralelamente, os resultados obtidos nesta experiência demonstram que a estratégia de tratamento do armazenamento dos frutos em ACD, não foi eficaz no controlo do AI, revelando inclusive valores de incidência superiores aos frutos controlo. Guterres (2013) também havia reportado um aumento da incidência de AI em frutos tardios durante o armazenamento em ACD, comparativamente com a incidência registada nos frutos armazenados em ACI. No entanto, os valores de incidência e severidade de AI reportados nesse ensaio foram superiores aos registados neste estudo, provavelmente devido ao facto do estado de maturação à colheita dos frutos ser mais avançado. Demonstrando assim a importância e influência do estado de maturação dos frutos, na suscetibilidade dos mesmos ao desenvolvimento do AI em pera 'Rocha'.

4.2.3. Níveis dos metabolitos fermentativos

Como referido na Exp.1 a acumulação dos metabolitos fermentativos como o etanol e acetaldeído aparentam demonstrar uma relação com o surgimento do AI nos frutos armazenados em atmosfera controlada. Na Fig. 25A podemos observar que em todos os tratamentos, ocorreu uma subida dos níveis de etanol durante o armazenamento face aos valores da colheita.

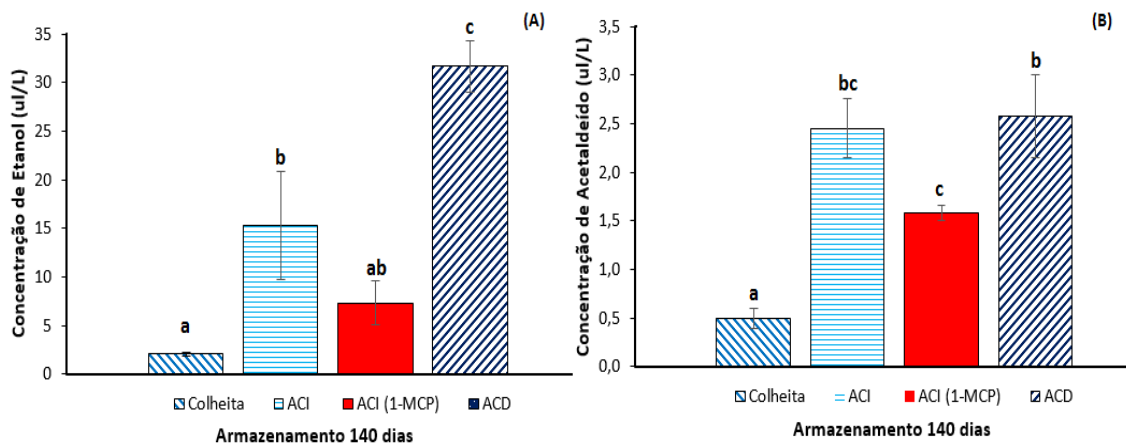


Figura 25- Níveis dos metabolitos fermentativos à colheita e ao fim de 140 dias de armazenamento, etanol (A) acetaldeído (B) em peras no estado de maturação ótimo, durante o armazenamento atmosfera controlada indutora (2% O₂ + 10% CO₂), armazenamento em atmosfera controlada indutora tratamento com 312 ppb 1-MCP (2% O₂ + 10% CO₂) e atmosfera controlada diferida (21 dias Frio normal+ AC Indutora). Os valores representam a média de 3 réplicas de 3 frutos cada \pm desvio padrão.

Os frutos armazenados em ACD foram os que apresentaram a maior concentração de etanol (31,6 µl/L), com um aumento quase sete vezes superior face ao valor apresentado à colheita (4,6 µl/L), seguido depois dos frutos em ACI (23,9 µl/L) com um aumento de cerca de cinco vezes. E por fim os frutos em ACI tratados com 1-MCP (7,3 µl/L), revelando um aumento de apenas uma vez e meia face aos valores obtidos à colheita. Estes dados demonstram que os frutos com maior incidência de AI, foram também os que registaram maior concentração de etanol no fim do armazenamento, coincidindo com os dados reportados por Pintó et al. (2001). Relativamente ao acetaldeído, o efeito das diferentes modalidades de tratamento não teve um impacto tão definido como o obtido nos níveis do etanol (Fig. 25B). Os níveis de acetaldeído dos frutos armazenados em ACI (2,8 µl/L) e ACD (2,5 µl/L), foram muito aproximados, enquanto que os encontrados nos frutos tratados com 1-MCP (1,8 µl/L) foram inferiores. Estes resultados sugerem que talvez o aumento da concentração do acetaldeído não esteja apenas relacionado às condições de armazenamento mas também aos processos de maturação dos frutos que se vão sucedendo ao longo do tempo. Podendo também explicar os valores inferiores dos frutos tratados com 1-MCP, dado que este atua sobre os processos de maturação dos frutos. Os resultados demonstram ainda que o aumento da concentração de etanol aparenta estar relacionado com o aumento da

incidência de AI durante o armazenamento dos frutos, revelando-se como um potencial marcador bioquímico para determinar a sensibilidade dos frutos ao desenvolvimento do AI durante o seu armazenamento prolongado em AC.

5. Conclusão

Considerando os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que os níveis de CO_2 elevados durante o armazenamento em AC influenciam a suscetibilidade da pera 'Rocha' no desenvolvimento de AI, afetando os diversos componentes integrados no sistema antioxidante e fermentativo dos frutos. A incidência mais elevada de AI nos frutos armazenados em ACI, poderá ser explicada pela atividade inferior da SOD (enzima responsável pela eliminação do superóxido), bem como pela atividade superior da PPO (responsável pela oxidação dos compostos fenólicos que vão formar os pigmentos castanhos característicos no AI). Para além destes fatores, a descida dos níveis de ácido ascórbico para concentrações muito baixas durante o armazenamento da pera, poderá comprometer o funcionamento adequado do seu sistema antioxidante. Tudo isto aliado à acumulação de metabolitos fermentativos nos frutos, devido às condições de baixo O_2 e alto CO_2 apresentadas durante o armazenamento, também aparentam contribuir para a diminuição da capacidade dos frutos para combater o stress oxidativo a que estão expostos e consequentemente desencadear o desenvolvimento de AI. Relativamente à avaliação da eficácia de diferentes estratégias de controlo para prevenir a incidência do AI em AC (Exp. 2), podemos concluir que o 1-MCP contribuiu para o controlo do AI durante o armazenamento em AC. Por sua vez, a ACD não foi eficaz no controlo do AI para a pera 'Rocha', revelando-se até um aumento da incidência de AI nos frutos armazenados nesta modalidade de tratamento. Relativamente aos metabolitos fermentativos, os níveis aumentaram em todas as condições de armazenamento. O aumento mais acentuado nos níveis de etanol foi registado nos frutos em ACD, aparentando estarem relacionados com a incidência superior de AI nestes frutos. Pelo contrário, nos frutos tratados com 1-MCP, o aumento da concentração de etanol foi claramente inferior, quando comparado com os outros tratamentos, levando à conclusão de que os níveis elevados de etanol aparentam estar ligados com o aumento da incidência de AI. No caso do acetaldeído, todos os tratamentos também apresentaram um aumento na sua concentração, tendo os valores mais altos sido registados nos frutos em ACI. No entanto estes dados não revelaram diferenças tão marcadas como as observadas no etanol, não aparentando estar diretamente correlacionado com a incidência de AI, mas sim com a própria maturação dos frutos.

Até à data o mecanismo que despoleta o AI em pera 'Rocha' ainda não se encontra totalmente elucidado. No entanto, este estudo revela que este deverá ser causado por

variados fatores que vão influenciar o comportamento dos diversos mecanismos essenciais para a sobrevivência dos frutos, durante o seu armazenamento em AC. Desde as características de cada cultivar até às características físico-químicas individuais de cada fruto. Não esquecendo também o papel dos componentes individuais da atmosfera durante o armazenamento dos frutos. Neste sentido, é então essencial prosseguir com pesquisas mais aprofundadas sobre as componentes fundamentais ligadas a estes acidentes fisiológicos de forma a ser possível obtermos uma solução mais adequada para o seu controlo.

6. Referências bibliográficas

- Afzal, F., Khurshid, R., Ashraf, M. & Kazi, A. G., 2014. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Response to Pathogens and Wounding. Em: P. Ahmad, ed. *Oxidative Damage to Plants*. London : Elsevier, pp. 397-424.
- Agrotec, 2014. *Pêra Rocha do Oeste atingiu recorde de exportações*. Disponível em: <http://agrotec.pt/pera-rocha-oeste-atingiu-recorde-de-exportacoes/>
- Almeida, D., 2005. *Manuseamento de Produtos Hortofrutícolas*. Porto: SPI.
- Almeida, D., 2013. *Produtores de pera rocha preocupados com quebras nas vendas por alterações comunitárias*. Disponível em: http://www.dinheirovivo.pt/economia/interior.aspx?content_id=3740191&page=-1
- Alpalhão, A., Neto, C., Goulão, L.; Clemente, J., Henriques, J., Lourenço, I., Oliveira, C. M., 2006. *Efeito do 1-metilciclopropeno em pêra 'Rocha' em diferentes estados de maturação armazenadas em atmosfera normal*. Alcobaça, I Simpósio Nacional de Fruticultura.
- Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S. Y. & Oleszek, W., 1995. Influence of Cultivar, Maturity Stage, and Storage Conditions on Phenolic Composition and Enzymatic Browning of Pear Fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 45, p. 1132–1137.
- ANP, 2013. *Caderno de Especificações da Pera Rocha D.O.P.*, Região do Oeste: Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha.
- ANP, 2013. *Relatório de existências de pera Rocha a 31 Dezembro, Campanha Comercial 2013/2014*, Região do Oeste: Associação Nacional de Produtores de Pera Rocha.
- ANP, 2015. *Onde se produz*. Disponível em: <http://www.perarocha.pt/CustomPages/ShowPage.aspx?pageid=fc0b621e-0daa-4c0d-8d1b-76314e355374#notop>
- Apel, K. & Hirt, H., 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, Signal Transduction. *Annual Reviews Plant Biology*, 12 Janeiro.
- Avelar, M. & Rodrigues, A., 1999. *Teste de regressão do amido em pera 'Rocha'*, Alcobaça: Estação Nacional de Fruticultura Vieira Natividade.
- Awad, M. A. & Jager, A. d., 2003. Influences of air and controlled atmosphere storage on the concentration of potentially healthful phenolics in apples and other fruits. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 27, pp. 53-58.

- Bai, J., Prange, R. K. & Toivonen, P. M., 2009. Pome Fruits. Em: E. M. Yahia, ed. *Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities*. Boca Raton: CRC Press, pp. 277-280.
- Beaudry, R. M., 1999. Effect of O₂ and CO₂ partial pressure on selected phenomena. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 15, p. 293–303.
- Benzie, I. F. & Strain, J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Elsevier*, Volume 239, pp. 70-76.
- Bhattacharjee, S., 2010. Sites of Generation and Physicochemical Basis of Formation of Reactive Oxygen Species in Plant Cell. Em: S. D. Gupta, ed. *Reactive oxygen species and Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton: CRC Press, pp. 1-30.
- Blankenship, S. M. & Dole, J. M., 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 28, p. 1–25.
- Bonekamp, N. A., Volkl, A., Fahimi, H. D. & Schrader, M., 2009. Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *Biofactors*, Julho, pp. 346-355.
- Bradford, M. M., 1976. A Rapid Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Binding. *Analytical Biochemistry*, Volume 72, pp. 248-254.
- Brennan, T. & Frenkel, C., 1977. Involvement of Hydrogen Peroxide in the Regulation of Senescence in Pear. *Plant Physiology*, Volume 59, p. 411–416.
- CAP, 2010. *Informação do Sector de Frutos e Produtos Hortofrutícolas*, s.l.: CFLinfo.
- Carvalho, A. R. S. C. d., 2011. *Aplicação de SmartFresh em pêra 'Rocha' Eficácia de Concentrações e Modalidades de Armazenamento na Qualidade e na Incidência de Escaldão Superficial e Acastanhamento Interno*, Lisboa: Instituto Superior de Agronomia Universidade Técnica de Lisboa.
- Castro, E. d., Barrett, D. M., Jobling, J. & Mitcham, E. J., 2008. Biochemical factors associated with a CO₂-induced flesh browning disorder of Pink Lady apples. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 48, p. 182–191.
- Cavaco, M., 2012. *Normas e Técnicas para a Produção Integrada de Pomóideas (Volume II)*, Lisboa: DGADR.
- Chemspider , 2015. *Ethanal*.
 Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.172.html>
 [Acedido em 3 Julho 2015].
- Chemspider, 2015. *Ethanol*.
 Disponível em: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.682.html?rid=c396e4f5-4566-4b40-9e14-311249763bb8&page_num=0
 [Acedido em 3 Julho 2015].

- Chemspider, 2015. *Ethoxyquin*.
 Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3177.html>
 [Acedido em 18 Março 2015].
- Chemspider, 2015. *Methycyclopropene*.
 Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.133162.html>
 [Acedido em 20 Março 2015].
- Chervin, C., Brady, C. J., Patterson, B. D. & Faragher, J. D., 1996. Could studies on cell responses to low oxygen levels provide improved options for fruit storage and disinfestation?. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 7, p. 289–299.
- Chiriboga, M.-A., Schotsmans, W. C., Larrigaudière, C., Dupille, E., Recasens, I., 2012. Responsiveness of 'Conference' pears to 1-methylcyclopropene: the role of harvest date, orchard location and year. *Science Food and Agriculture*, Volume 93, pp. 619–625.
- Claiborne, A., 1985. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton: CRC.
- Comissão Europeia, 2011. *Regulamento de Execução (UE) Nº 540/2011*, Bruxelas: Jornal Oficial da União Europeia.
- Comissão Europeia, 2013. *REGULAMENTO (UE) N.º 772/2013*, Bruxelas: Jornal Oficial da União Europeia.
- Comissão Europeia, 2014. *Regulamento (UE) 703/2014*, Bruxelas: Jornal Oficial da União Europeia.
- DeEll, J. R. & Ehsani-Moghaddam, B., 2012. Delayed controlled atmosphere storage affects storage disorders of 'Empire' apples. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 67, p. 167–171.
- Deuchand, T., Fidalgo, F., Larrigaudière, C. & Almeida, D., 2012. *Internal browning disorders during storage of 'Rocha' pear: effects of harvest maturity and CO2 partial pressure*, Lleida: Universitat de Lleida.
- Deutsch, J. C., 1998. Ascorbic Acid Oxidation by Hydrogen Peroxide. *Analytical Biochemistry*, Volume 255, pp. 1-7.
- Dilley, D. R., 2006. Development of controlled atmosphere storage technologies. *Stewart Postharvest Review*, Volume 2, pp. 1-8.
- DRAPLVT, 2007. *Programa de desenvolvimento rural 2007-2013, Estratégia para a Região de Lisboa e Vale do Tejo, Fileira da Fruta*, Lisboa e Vale do Tejo: Direcção Regional de Agricultura e Pescas de Lisboa e Vale do Tejo.
- Drzyzga, O., 2003. Diphenylamine and derivatives in the environment: a review. *Chemosphere*, Volume 53, p. 809–818.

- Dudley, R., 2004. *Ethanol, Fruit Ripening, and the Historical Origins of Human Alcoholism in Primate Frugivory*. Louisiana, Society for Integrative and Comparative Biology.
- Eram, M. S. & Ma, K., 2013. Decarboxylation of Pyruvate to Acetaldehyde for Ethanol Production by Hyperthermophiles. *Biomolecules*, Volume 3, pp. 578-596.
- Ferguson, I., Volz, R. & Woolf, A., 1999. Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 15, p. 255–262.
- Franck, C., Baetens, M., Lammertyn, J., Scheerlinck, N., Davey, M.W., Nicolai, B. M., 2003. Ascorbic acid mapping to study core breakdown development in 'Conference' pears. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 30, p. 133–142.
- Franck, C., Lammertyn, J., Ho, Q. T., Verboven, P., Verlinden, B., Nicolai, B.M., 2007. Browning disorders in pear fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 43, p. 1–13.
- Galeaazzi, M. A. M. & Scarbieri, V. C., 1981. Substrate Specificity and Inhibition of Polyphenoloxylase (PPO) from a Dwarf Variety of Banana (*Musa Cavendishii* L.). *Journal of Food Science*, Volume 46, pp. 1404 - 1406.
- Galvis-Sánchez, A., Fonseca, S., Morais, A. & Malcata, F., 2003. Physicochemical and Sensory Evaluation of 'Rocha' Pear Following Controlled Atmosphere Storage. *Journal of Food Science*, Volume 68, p. 318–327.
- Giannopolitis, C. N. & Ries, S. K., 1977. Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*, Volume 59, p. 315–318.
- Gill, S. S. & Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 48, pp. 909-930.
- Gil, M. I., Gorny, J. R. & Kader, A. A., 1998. Responses of Fuji Apple Slices to Ascorbic Acid Treatments and Low Oxygen Atmospheres. *HortScience*, Volume 33, pp. 305-309 .
- Guterres, U. d. N., 2013. *Acastanhamento interno em pera 'Rocha' durante o armazenamento prolongado: marcadores bioquímicos e estratégias de controlo*, Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V. & Peralta, R. M., 2012. Phenolic compounds in fruits – an overview. *Journal of Food Science and Technology*, Volume 47, p. 2023–2044.
- Hodges, D. M., Lester, G. E. & Munro, K. D., 2004. Oxidative Stress: Importance for Postharvest Quality. *HortScience*, Volume 39, pp. 924-929 .

- Imahori, Y., 2014. Role of Ascorbate Peroxidase in Postharvest Treatments of Horticultural Crops. Em: P. Ahmad, ed. *Oxidative Damage to Plants*. London: Elsevier, pp. 425-451.
- Ingham, L. M., Parker, M. L. & Waldron, K. W., 1998. Peroxidase: Changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples. *Physiologia Plantarum*, Volume 102, p. 93–100.
- Isidoro, N. & Almeida, D. P., 2006. α -Farnesene, conjugated trienols, and superficial scald in 'Rocha' pear as affected by 1-methylcyclopropene and diphenylamine. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 42, p. 49–56.
- Jung, S.-K. & Watkins, C. B., 2011. Involvement of ethylene in browning development of controlled atmosphere-stored 'Empire' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 59, p. 219–226.
- Kader, A. A., 1995. *Regulation of Fruit Physiology by Controlled/Modified Atmospheres*, Davis: Acta Horticulturae.
- Ke, D., Mateos, M. & Kader, A. A., 1993. *Regulation of Fermentative Metabolism in fruits and Vegetables by Controlled Atmospheres*. Ithaca, Cornell University.
- Ke, D., Yahia, E., Mateos, M. & Kader, A. A., 1994. Ethanolic Fermentation of 'Bartlett' Pears as Influenced by Ripening Stage and Atmospheric Composition. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, Volume 119, pp. 976-982 .
- Kupferman, E. & Gutzwiller, J., 2003. *Use of Diphenylamine, Ethoxiquin and Semperfresh on Anjou Pears*, Washington: Washington State University.
- Lammertyn, J. Aerts, M., Verlinden, B. E., Schotsman, W., Nicolai, B. M., 2000. Logistic regression analysis of factors influencing core breakdown in 'Conference' pears. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 20, p. 25–37.
- Larrigaudière, C., Lentheric, I., Pintó, E. & Vendrell, M., 2001. Short-term effects of air and controlled atmosphere storage on antioxidant metabolism in conference pears. *Plant Physiology*, Volume 158, p. 1015–1022.
- Larrigaudière, C., Lentheric, I., Puy, J. & Pintó, E., 2004. Biochemical characterisation of core browning and brown heart disorders in pear by multivariate analysis. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 31, p. 29–39.
- Larrigaudière, C., Lentheric, I. & Vendrell, M., 1998. Relationship Between Enzymatic Browning and Internal Disorders in Controlled-Atmosphere Stored Pears. *Journal of Science, Food and Agriculture*, Volume 78, p. 232–236.
- Larrigaudière, C., Vilaplana, R., Soria, Y. & Recasens, I., 2004. Oxidative behaviour of Blanquilla pears treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 84, p. 1871–1877.

- Latowski, D., Surówka, E. & Strzałka, K., 2010. Regulatory Role of Components of Ascorbate–Glutathione Pathway of Ascorbate–Glutathione Pathway. Em: N. A. Anjum, S. Umar & M. Chan, edits. *Ascorbate–Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. London: Springer, pp. 1-53.
- Laurigaudière, C., Toivonen, P., Vilaplana, R. & Valentines, M. C., 2006. Antioxidant Potential and Peroxidative State of 'Golden Smothee' Apples Treated with 1-Methylcyclopropane. *Science of Food and Agriculture* .
- Lin, Z., Zhong, S. & Grierson, D., 2009. Recent advances in ethylene research. *Experimental Botany*, Volume 60, pp. 3311-3336.
- Liu, R., Lai, T., Xu, Y. & Tian, S., 2012. Changes in physiology and quality of Laiyang pear in long time storage. *Scientia Horticulturae*, Volume 150, p. 31–36.
- Lurie, S., 2003. Antioxidants. Em: D. Hodges, ed. *Postharvest oxidative stress in Horticultural Crops*. s.l.:CRC Press, pp. 131-150.
- Marques, I. S. M. A., 2012. *Conservação de frutas: Redução de doenças de pós-colheita em pera 'Rocha'*, Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade Nova de Lisboa.
- Millerd, A., Bonner, J. & Biale, J. B., 1952. *The Climateric Rise in Fruit Respiration as Controlled by Phosphorylative Coupling*, Pasadena: California Institute of Technology.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science*, Volume 7, p. 405–410.
- Monteiro, D. M. S. & Caswell, J. A., 2009. Traceability adoption at the farm level: An empirical analysis. *Elsevier*, Volume 34, p. 94–101.
- Morris, J. R. & Brady, P. L., 2005. Temperature Effects on Produce Degradation. Em: *Produce Degradation Pathways and Prevention*. Boca Raton: CRC Press, pp. 599-633.
- Mosha, L. W. T. & Nyepi, M., 2005. Nutrient Loss. Em: *Produce Degradation Pathways and Prevention*. Boca Raton: CRC Press, pp. 223-258.
- Nakano, Y. & Asada, K., 1981. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, Volume 22, pp. 867-880.
- National Library of Medicine, 2011. *National Library of Medicine- Medical Subject Headings Laccase*.
 Disponível em:
https://www.nlm.nih.gov/cgi/mesh/2011/MB_cgi?mode=&term=Laccase
 [Acedido em 18 Junho 2015].

- Nguyen, T., Verboven, P., Schenk, A. & Nicolai, B. M., 2007. Prediction of water loss from pears (*Pyrus communis* cv. Conference) during controlled atmosphere storage as affected by relative humidity. *Journal of Food Engineering*, Volume 83, p. 149–155.
- Noctor, G. & Foyer, C. H., 1998. *Ascorbate and Glutathione: Keeping Oxygen Under Control*, s.l.: Annual Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Bio.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neurkermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H., 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment*, Volume 35, pp. 454-484.
- Nunes, A. P., Martins, M. d. C. & Catarina, R., 2013. *Boletim Informativo*, Leiria: Centro Operativo e Tecnológico Hortofrutícola Nacional.
- Obanda, M. & Owuor, P. O., 1997. Flavanol composition and caffeine content of green leaf as quality potential and aromatic plant extract. *Science Food and Agriculture*, Volume 74, pp. 209-215.
- Observatório Agrícola, 2013. *Relatório Anual 2013, Evolução das cotações da Pêra*, s.l.: Observatório dos Mercados Agrícolas e das Importações Agroalimentares.
- Pesis, E., 2005. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 37, p. 1–19.
- Pintó, E., Lenthéric, I., Vendrell, M. & Larrigaudière, C., 2001. Role of fermentative and antioxidant metabolisms in the induction of core browning in controlled-atmosphere stored pears. *Science of Food and Agriculture*, Volume 81, pp. 364-370.
- Portugal Foods, 2012. *Portugal Excepcional, Estratégia de Internacionalização do Sector Agro-Alimentar 2012-2017*, Maia: Portugal Foods.
- Rao, M., Paliyath, G. & Ormrod, D., 1996. Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, Volume 110, pp. 125-136 .
- Rhoads, D. M., Umbach, A. L., Subbaiah, C. C. & Siedow, J. N., 2006. Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiology*, Volume 141, pp. 357-366 .
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. & Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Plant Science*, Volume 2, p. 152–159.
- Richard-Forget, F. C. & Gaillard, F. A., 1997. Oxidation of Chlorogenic Acid, Catechins, and 4-Methylcatechol in Model Solutions by Combinations of Pear (*Pyrus communis* Cv. Williams) Polyphenol Oxidase and Peroxidase: A Possible

- Involvement of Peroxidase in Enzymatic Browning. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Volume 45, p. 2472–2476.
- Rinetour, M., Mangrich, M. & Saltveit, J. B. A. R. M., 1997. Ethanol Effects on the ripening of climateric fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 12, p. 35–42.
- Río, L. A. d. Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Barroso, J. B., 2003. Plant Peroxisomes, Reactive Oxygen Metabolism and Nitric Oxide. *Taylor and Francis Healthsciences*, Volume 55, pp. 71-81.
- Robards, K. Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, Volume 66, p. 401–436.
- Rocha, A. & Morais, A., 2001. Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. *Food Control*, Volume 12, p. 85–90.
- Rowlett, R., 2001. *U.S. Commercial Bushel Sizes*.
 Disponível em: <http://www.unc.edu/~rowlett/units/scales/bushels.html>
 [Acedido em 15 Junho 2015].
- Saquet, A., Streif, J. & Bangerth, F., 2003. Energy metabolism and membrane lipid alterations in relation to brown heart development in 'Conference' pears during delayed controlled atmosphere storage. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 30, p. 123–132.
- Schotsmans, W. C., DeLong, J. M., Larrigaudière, C. & K., P. R., 2009. Effects on Physiological Disorders. Em: *Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities*. Boca Raton: CRC Press, pp. 160-179.
- Sharma, I. & Ahmad, P., 2014. Catalase, a Versatile Antioxidant in Plants. Em: P. Ahmad, ed. *Oxidative Damage to Plants*. London: Elsevier, pp. 131-148.
- Silva, F., Fidalgo, F., Gomes, M. & Almeida, D., 2008. *Effect of 1-Methylcyclopropene and Diphenylamine on Storage Disorders and Water-Soluble Antioxidants of 'Rocha' Pear*. Peniche, 10th International Pear Symposium.
- Silva, F. J., 2006. *Atividade antioxidante da cv. Pera Rocha e a ocorrência de desordens fisiológicas durante o armazenamento*, Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Silva, F. J., Gomes, M. H., Fidalgo, F. & Almeida, D. P. F., 2009. *Influência da atmosfera controlada diferida na actividade antioxidante e acastanhamentos internos da pêra 'Rocha'*. Alcobaça, I Simpósio Nacional de Fruticultura.

- Silva, F. J. Gomes, M. H., Fidalgo, F., Rodrigues, J. A., Almeida, D. P.F., 2008. Antioxidant Properties and Fruit Quality During Long Term Storage of 'Rocha' Pear: Effects of Maturity and Storage Conditions. *Journal of Food Quality*, Volume 33, p. 1–20.
- Szöllösi, R., 2014. Superoxide Dismutase (SOD) and Abiotic Stress Tolerance in Plants: An Overview. Em: P. Ahmad, ed. *Oxidative Damage to Plants*. London: Elsevier, pp. 89-129.
- Tanrioven, D. & Eksi, A., 2005. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars. *Food Chemistry*, Volume 93, p. 89–93.
- Thompson, A. K., 2010. *Controlled Atmosphere Storage of Fruits and Vegetables*. Cambridge: CABI.
- Tomás-Barberán, F. A. & Espín, J. C., 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Science of Food and Agriculture*, Volume 81, p. 853–876.
- Tomás, C. & Azevedo, V., 2013. *Produto químico banido da pera 'Rocha'*. Disponível em: <http://expresso.sapo.pt/produto-quimico-perigoso-banido-da-pera-rocha=f837707> [Acedido em 18 Março 2015].
- USDA, 2015. *Pyrus communis* L.. Disponível em: <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=PYCO>
- Valero, D. & Serrano, M., 2010. Fruit Ripening. Em: *PostHarvest Biology and Technology for Preserving Fruit Quality*. Boca Raton: CRC press.
- Vámos-Vigyázó, L. & Haard, N. F., 1981. *Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables*, s.l.: CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition.
- Veltman, R. H., 2002. *On the origin of internal browning in pears (Pyrus communis L. cv. Conference)*, Wageningen: Wageningen Universiteit.
- Veltman, R. Kho, R.M., Schaik, A.C.R. Van, Sanders, M.G., Oosterhaven, J., 2000. Ascorbic acid and tissue browning in pears (*Pyrus communis* L. cvs Rocha and Conference) under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, Volume 19, p. 129–137.
- Veltman, R. Laurrigaudière, C., Wichers, H.J., Schaik, A.C.R. Van, Plas, L.H.W. Van Der, Oosterhaven, J., 1999. PPO Activity and Polyphenol Content are not Limiting Factors During Brown Core Development in Pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference). *Plant Physiology*, Volume 154, p. 697–702.

- Veltman, R. Sandersa, M.G., Persijnb, S.T., Peppelenbosa, H.W., Oosterhavena, J., 1999. Decreased ascorbic acid levels and brown core development in pears (*Pyrus communis* L. cv. Conference).. *Physiologia Plantarum*, Volume 107, p. 39–45.
- Verlinden, B. E. Jager, A. de, Lammertyn, J.; Schotsmans, W., Nicolai, B. M., 2002. Effect of Harvest and delaying Controlled Atmosphere Storage Conditions on Core Breakdown Incidence in 'Conference' Pears. *Postharvet Technology*, Volume 83, p. 339–347.
- Wąskiewicz, A., Beszterda, M. & Golinski, P., 2014. Nonenzymatic Antioxidants in Plants. Em: P. Ahmad, ed. *Oxidative Damage to Plants*. London: Elsevier, pp. 201-234.
- Watkins, C. B., 2014. 1-Methylcyclopropene (1-MCP). Em: K. C. Gross, C. Y. Wang & M. Saltveit, edits. *Agriculture Handbook number 66, The comercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nusery Stocks* . Beltsville: USDA.
- Yahia, E. M., 2009. History. Em: *Modified and Controlled Atmospheres for the Storage, Transportation, and Packaging of Horticultural Commodities*. Boca Raton: CRC Press, pp. 3-6.
- Yoruk, R. & Marshall, M. R., 2003. *Physicochemical Properties and Function of Plant Polyphenol Oxidase: A Review*, Florida: Institute of Food and Agricultural Sciences Food Science and Human Nutrition Department University of Florida.
- Yousuf, P. Y., Hakeem, K. U. R., Chandna, R. & Ahmad, P., 2012. Role of Glutathione Reductase in Plant Abiotic Stress. Em: P. Ahmad & M. Prasad, edits. *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*. New York: Springer, pp. 149-158.
- Zapata, S. & Dufour, J., 1992. Ascorbic, dehydroascorbic and isoascorbic acid simultaneous determination by reverse phase ion interaction HPLC. *Journal of Food Science*, Volume 57, p. 506–511.
- Zhang, Z., Schofield, C. J., Baldwin, J. E., Thomas, P., Philp, J., 1995. *Expression, purification and characterization of 1-Aminocyclopropane-1-carboxilate oxidase from tomato in Escherichia coli*, Great Britain: Biochem J. XXX faltam volume e páginas